



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Desarrollo de galletitas más saludables: Alternativas para
incrementar su contenido de antioxidantes***

Tesista

Lic. Mariela Patrignani

Directora

Dra. Cecilia Elena Lupano

Codirector

Dr. Gustavo Juan Rinaldi

Año

2017

*EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA
PLATA, FUE REALIZADO
EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (CIDCA-UNLP-CONICET-CIC)
BAJO LA
DIRECCIÓN DE LA DRA. CECILIA ELENA LUPANO Y
LA CODIRECCIÓN DEL DR. GUSTAVO JUAN RINALDI*

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas e instituciones que de alguna manera u otra contribuyeron al desarrollo de esta tesis doctoral y muy especialmente...

A mis directores Cecilia E. Lupano y Gustavo J. Rinaldi por haber confiado siempre en mí, por haberme guiado y acompañado en este trabajo

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las becas y subsidios que permitieron la realización de este trabajo.

A las autoridades y las personas del CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (CIDCA) y de la Facultad de Medicina de la UNLP por haberme permitido realizar la mayor parte del trabajo experimental.

Al Estado Nacional, a los responsables del Programa BEC.AR (Argentina) y SEPIE (España) por el otorgamiento de la beca para la estancia en Granada.

A la UNLP por el subsidio para estadías en el exterior que me permitió viajar a la ciudad de Salónica Grecia.

Al Laboratorio de Apicultura (Bee-Lab) de la Facultad de agricultura forestal y ambiente de la Universidad Aristotélica de Salónica, por permitirme realizar los análisis sobre mieles. Especialmente a Dra. Chrysoula Tananaki y al Dr. Prof. Andreas Thrasyvoulou por dirigirme durante esta experiencia.

Al Dr. José Ángel Rufián Henares de la Universidad de Granada, España por su dirección durante mis ensayos sobre melanoidinas realizados en dicha institución

A Paula que me formó en mis primeros pasos en el trabajo de laboratorio

A Néstor Malacalza por el contacto con los productores de miel y la recolección de muestras

A la Ing. Laura Battaiotto por su colaboración en los análisis de textura de los rellenos y la optimización de la formulación

A Guillermina Fagúndes por su aporte en el análisis palinológico en las mieles

A Cecilia Castells por colaboración en el análisis de compuestos volátiles el mieles.

A la doctora Leda Giannuzzi, por la orientación brindada en el análisis microbiológico.

A mi tía Mariela por sus comentarios y aportes en este proyecto

A Lucas y a Gabriel por su ayuda en la aplicación de modelos matemáticos

A todos mis compañeros del laboratorio de Cereales por siempre estar cuando los necesitaba, por los mates, la música, los consejos y los buenos momentos compartidos

A mis compañeros del Bee-Lab, por haberme permitido ser parte de su hermosa familia (Συμπολίτες Μέλισσα-Δαβ μου, που μου επιτρέψατε να είναι μέρος της όμορφης οικογένειάς σας.)

A todo el grupo de personas de la Universidad de Granada que me ayudaron durante mi estancia.

Al grupo de vegetales, a las chicas del laboratorio de aceites y a la gente de microbiología por siempre darme una mano y buenos consejos

A las cátedras de Introducción a la Química y Química General; Química Analítica Instrumental y al Área de Bromatología y Control de Alientos de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por formarme tanto en la docencia como académicamente.

A mis amigos y amigas, los que están lejos y los que están cerca, por ser mi apoyo incondicional y por brindarme todo su cariño en las buenas y en las malas.

A Joaquín por ser mi compañero, mi soporte, por su paciencia, sus consejos y todo el amor que me brinda cada día.

Y por sobre todo, a mi familia
a quienes les dedico esta tesis

*Cambiaré de opinión tantas veces y tan a menudo como
adquiera conocimientos nuevos*

Florentino Ameghino

A partir de los resultados de esta tesis se publicaron los siguientes trabajos en revistas internacionales y actas de congresos

M. Patrignani; G.J. Rinaldi; C.E. Lupano. In vivo effects of Maillard reaction products derived from biscuits. Food Chemistry (doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.038)

M. Patrignani, P. A. Conforti, C. E Lupano, The role of lipid oxidation on biscuit texture during storage. International Journal of Food Science & Technology (doi: 10.1111/ijfs.12550)

M. Patrignani, P.A Conforti, C.E. Lupano. Lipid oxidation in biscuits: Comparison of different lipid extraction methods. Journal of Food Measurement and Characterization (doi 10.1007/s11694-014-9215)

M. Patrignani, C.E. Lupano. Actividad antioxidante de mieles Argentinas de la provincia de Buenos Aires y la región Andino Patagónica. Trabajo completo presentado en el VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC). Córdoba, Argentina 2016

M. Patrignani, C.E. Lupano. Incorporación de saborizantes naturales a galletitas: Efecto sobre el poder antioxidante del producto final. Trabajo completo presentado en el VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC). Córdoba, Argentina 2016

M. Patrignani, C.E. Lupano. Efecto de la temperatura de cocción sobre el desarrollo de antioxidantes en galletitas. Trabajo completo presentado en el VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC). Córdoba, Argentina 2016

M. Patrignani; L.L. Battaiotto; P.A. Conforti; C.E. Lupano. Uso de miel en reemplazo de sacarosa en rellenos dulces de galletitas y su influencia sobre la capacidad antioxidante del producto final. Trabajo completo presentado en el XV Congreso Argentino de Ciencia Y Tecnología de Alimentos

L.L. Battaiotto; M. Patrignani; P.A. Conforti; C.E. Lupano. Actividad acuosa y parámetros de textura de rellenos de galletitas: uso de miel en reemplazo de sacarosa. Trabajo completo presentado en el XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

M. Patrignani; P.A. Conforti; C.E. Lupano. Almacenamiento de galletitas elaboradas con distintos aceites. Resumen presentado en el V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

M. Patrignani; C.E. Lupano. Desarrollo de textura y color en galletitas semidulces durante el horneado. Resumen presentado en el V congreso internacional de ciencia y tecnología de alimentos

Resumen

El presente trabajo de tesis está enfocado al desarrollo de alimentos más saludables, con un alto contenido de antioxidantes.

Las galletitas dulces son uno de los alimentos más consumidos en Argentina. Estos productos son altamente calóricos, y suelen presentar altos niveles de azúcar, grasas saturadas y grasas *trans*. Sin embargo, es posible modificar su formulación y sus condiciones de procesamiento de modo tal de obtener un producto final de mejor calidad nutricional, buena aceptabilidad y con un alto contenido de antioxidantes.

Considerando esto, el objetivo general de este trabajo fue desarrollar una galletita rellena más saludable que los productos equivalentes que existen en el mercado, y con un alto contenido de antioxidantes. Para esto el trabajo se enfocó en tres secciones: en el uso de aceites vegetales en las tapas de galletitas y el desarrollo de antioxidantes durante su proceso de cocción; en el uso de miel en reemplazo parcial de la fase grasa y el azúcar refinado en los rellenos, y finalmente en la incorporación de saborizantes a la formulación de galletitas, evaluando la aceptabilidad y el tiempo de vida útil del producto final.

Se encontró que el aceite de girasol alto oleico mejoraba el perfil de ácidos grasos en las tapas de galletitas generando un producto más saludable y estable a la oxidación durante el tiempo de conservación. Se pudo concluir también que el tratamiento térmico aplicado a las galletitas durante el horneado influye fuertemente en el contenido de antioxidantes del producto, asociado a la presencia de compuestos de Maillard. Un tratamiento térmico de alta temperatura por corto tiempo (150 °C por 30 min) genera un mayor contenido de compuestos antioxidantes que un tratamiento prolongado a baja temperatura (100 °C por 80 min). Durante la digestión, parte de los compuestos de Maillard son liberados por las enzimas digestivas y luego pueden ser absorbidos. Por otro lado, la fracción no liberada por las enzimas digestivas llega al intestino grueso donde puede ser metabolizada por las bacterias colónicas, incrementando el poder antioxidante *in situ*. En concordancia con estos resultados, los ensayos *in vivo* realizados sobre ratas Wistar mostraron que el consumo de una dieta con alto contenido de compuestos de Maillard incrementa el poder antioxidante en suero a la vez que disminuye su nivel de oxidación lipídica, incrementa la relación de bacterias lácticas sobre bacterias totales, tiene un efecto antihipertensivo (probablemente relacionado a su capacidad antioxidante), y no disminuiría la absorción aparente de minerales.

Para incrementar el contenido de antioxidantes en rellenos de galletitas se evaluaron mieles de distintas regiones de la Argentina (Provincia Paranaense, Provincia del Espinal distrito Talar, Provincia Pampeana distrito Oriental y región Andina Patagónica). Las mieles de la región Andino Patagónica resultaron ser las más adecuadas para la preparación de rellenos:

presentaban una baja humedad, un alto contenido de antioxidantes y los mayores niveles de compuestos volátiles. A partir de modelos matemáticos fue posible optimizar la formulación de rellenos de galletitas, obteniendo un producto con características de textura similares a la de los rellenos comerciales pero reemplazando parcialmente la manteca de cacao y el azúcar refinado por miel. El relleno final obtenido resultó estable durante seis meses, y su capacidad antioxidante se mantuvo prácticamente sin cambios.

La incorporación de saborizantes como la canela y el chocolate incrementa el poder antioxidante de las masas y de las galletitas, a pesar de que parte de los compuestos con capacidad antioxidante son termolábiles y se pierden durante la cocción. La canela presentó la mayor capacidad antioxidante en el producto horneado y por esto fue incorporada en la formulación de las tapas de galletitas. Las galletitas rellenas obtenidas presentaron una excelente aceptabilidad sensorial y una alta intención de compra y de consumo. Además, tenían un menor contenido de lípidos y grasas saturadas que productos similares encontrados actualmente en el mercado.

Estos ensayos demuestran que es posible obtener productos de mejor calidad nutricional con una buena aceptabilidad y con una alta capacidad antioxidante mediante el control de las condiciones de cocción y el uso ingredientes naturales.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo 1: Introducción General

1.1 DIETA Y SALUD	1
1.1.1 Alimentos con efectos beneficiosos para la salud	2
1.1.1.1 Promotores de la salud cardíaca	3
1.1.1.2 Crecimiento y desarrollo en la primera infancia	6
1.1.1.3 Reguladores metabólicos	6
1.1.1.4 Promotores de la salud intestinal	7
1.1.1.5 Defensa contra el estrés oxidativo	7
Productos derivados de la reacción de Maillard	9
Miel	9
Saborizantes naturales.....	9
1.1.2 Normativa y marco legal	10
1.2 PRODUCTOS DE PANADERÍA	11
1.2.1 Galletitas.....	12
1.2.2 Galletitas rellenas	14
1.2.3 Mercado de las galletitas en Argentina	15

Capítulo 2:Objetivos

2. OBJETIVOS.....	18
Objetivos abordados en cada capítulo.....	18

Capítulo 3:Galletitas

3.1 INTRODUCCIÓN	19
3.1.1 Preparación de las galletitas: Ingredientes.....	19
3.1.1.1 Harina de trigo	19
3.1.1.2 Almidón de maíz.....	20
3.1.1.3 Azúcar	20
3.1.1.4 Leche en polvo descremada (LPD).....	20
3.1.1.5 Agentes leudantes	21

3.1.1.6 Aceites y grasas	21
Etapa de iniciación de la oxidación lipídica.....	22
Etapa de propagación	23
Etapa de finalización	23
3.1.2 Preparación de las galletitas: Cocción	24
1 ^{ra} Etapa de la reacción de Maillard	25
2 ^{da} Etapa	25
3 ^{ra} Etapa	26
3.1.2.1 Efectos fisiológicos de los productos de Maillard.....	26
Capacidad antioxidante de productos de Maillard	27
Inhibición del crecimiento de tumores	27
Actividad antimicrobiana	28
Actividad prebiótica de productos de Maillard	28
Actividad antihipertensiva de productos de Maillard	29
3.2 OBJETIVOS.....	30
3.3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.3.1 Ingredientes utilizados para la preparación de galletitas	31
3.3.2 Selección del aceite: tiempo de conservación	31
3.3.2.1 Estabilidad oxidativa de los aceites	31
3.3.2.2. Elaboración y conservación de las galletitas.....	32
3.3.2.3 Actividad acuosa	33
3.3.2.4 Contenido de humedad.....	33
3.3.2.5 Color superficial.....	34
3.3.2.6 Análisis de textura.....	35
3.3.2.7 Determinación de compuestos primarios de oxidación lipídica.....	36
3.3.2.8 Determinación de los compuestos secundarios de oxidación lipídica.....	38
3.3.3 Condiciones de cocción: Desarrollo de compuestos de Maillard	40
3.3.3.1 Elaboración de las galletitas.....	40
3.3.3.2 Contenido de humedad.....	40
3.3.3.3 Color superficial.....	40
3.3.3.4 Actividad antioxidante de los compuestos de Maillard: Extracción.....	41
Digestión	42
Fermentación	43
3.3.3.5 Actividad antioxidante de los compuestos de Maillard: Determinación.....	44

Actividad antioxidante por DPPH	44
Actividad antioxidante por FRAP	45
Actividad antioxidante por ABTS	45
Medida de la actividad antioxidante de las fracciones insolubles	46
3.3.4. Efecto de los compuestos de Maillard Análisis <i>in vivo</i>	48
3.3.4.1 Preparación y análisis de las galletitas.....	48
Determinación de humedad	49
Determinación de proteínas	49
Determinación de lípidos	49
Determinación de cenizas	50
Determinación de fibra dietaria total	50
Contenido de hidratos de carbono exceptuando la fibra	50
Determinación del contenido de calcio, zinc y sodio en galletitas	50
3.3.4.2 Análisis de melanoidinas en galletitas	51
3.3.4.3 Diseño de las dietas	51
3.3.4.4 Animales, mantenimiento y diseño experimental.....	53
Medida de la presión arterial	53
Humedad de la materia fecal.....	56
Microbiota de homogenatos fecales	56
Absorción aparente de minerales	57
3.3.4.5 Sacrificio de las ratas	58
Poder antioxidante en el suero.....	58
Determinación de compuestos reactivos al TBA	59
3.3.5 Compuestos de Maillard como conservantes en galletitas	60
3.3.5.1 Conservación de galletitas horneadas a distintas temperaturas.....	60
3.3.5.2 Evaluación de compuestos primarios de oxidación lipídica	60
3.3.5.3 Determinación del perfil lipídico	60
3.3.6 Análisis estadístico	61
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
3.4.1 Selección del aceite	62
3.4.1.1 Estabilidad de aceites vegetales frente a la oxidación.....	62
3.4.1.2 Oxidación lipídica durante el tiempo de conservación de las galletitas	63
3.4.1.3 Evolución de la humedad y la a_w	65
3.4.1.4 Color.....	66

3.4.1.5 Textura de las galletitas durante el tiempo de conservación	67
3.4.2 Efecto de la cocción: reacción de Maillard en galletitas.....	69
3.4.2.1 Evolución del color en galletitas durante el horneado.....	69
3.4.2.2 Generación de antioxidantes.....	71
3.4.2.3 Capacidad antioxidante y color en galletitas	76
3.4.3 Efecto de los compuestos de Maillard <i>in vivo</i>	79
3.4.3.1 Composición de las galletitas y caracterización de las melanoidinas	79
3.4.3.2 Peso de los animales, consumo de alimento y eficiencia alimentaria	81
3.4.3.3 Actividad antioxidante y oxidación lipídica en suero	83
3.4.3.4 Microbiota fecal	86
3.4.3.5 Humedad de materia fecal y absorción aparente de minerales	88
3.4.3.6. Presión arterial	89
3.4.4 Efecto de los compuestos de Maillard como conservantes de galletitas	92
3.5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	94

Capítulo 4: Miel y Rellenos

4.1 INTRODUCCIÓN	96
4.1.1 Composición de los rellenos	96
4.1.1.1 Hidratos de carbono	96
4.1.1.2 Lípidos	96
4.1.1.3 Fibra dietaria e hidrocoloides	97
4.1.1.4 Ingredientes beneficiosos para la salud	98
4.1.2 Miel	99
4.1.2.1 Beneficios del consumo de miel.....	101
4.1.2.2 Uso de miel en productos alimenticios.....	102
4.2 OBJETIVOS.....	104
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
4.3.1 Ingredientes utilizados	105
4.3.2 Caracterización de mieles argentinas	105
4.3.2.1 Recolección de muestras.....	105
4.3.2.2 Humedad de mieles.....	106
4.3.2.3 Conductividad eléctrica	106

4.3.2.4 Color de mieles.....	106
4.3.2.5 Parámetros de frescura de miel.....	107
Hidroximetilfurfural (HMF)	107
Actividad diastásica.....	108
4.3.2.6 Determinación de compuestos volátiles	109
Extracción de los compuestos volátiles en miel.....	109
Separación y caracterización de los compuestos volátiles	110
4.3.2.7 Determinación de capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos.....	113
Preparación de las muestras	113
Contenido de fenoles totales (CFT).....	113
Ensayos de capacidad antioxidante	113
4.3.2.8 Análisis palinológico	114
4.3.3. Desarrollo de un relleno de galletitas con miel	115
4.3.3.1 Diseño de mezclas.....	115
Región de operatividad del modelo	115
4.3.3.2 Elaboración y caracterización de los rellenos	117
Textura de los rellenos	117
Actividad acuosa	119
Capacidad antioxidante de los rellenos	120
4.3.3.3 Obtención de superficies de respuesta	120
4.3.3.4 Optimización y validación del modelo.....	121
4.3.4 Vida útil de rellenos.....	124
4.3.4.1 Oxidación lipídica en rellenos	124
4.3.4.2 Humedad y actividad acuosa	124
4.3.4.3 Estabilidad de los antioxidantes durante el tiempo de conservación	124
4.3.4.4 Textura de rellenos	124
4.3.4.5 Recuento microbiano.....	124
4.3.5. Análisis estadístico	126
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	127
4.4.1 Selección de miel.....	127
4.4.1.1 Humedad, hidroximetilfurfural (HMF) y actividad diastasa	127
4.4.1.2 Conductividad y color de mieles.....	129
4.4.1.3 Contenido de antioxidantes en mieles.....	130
4.4.1.4 Compuestos volátiles en mieles y origen floral	133

4.4.2 Incorporación de miel a los rellenos de galletitas	137
4.4.2.1 Antioxidantes en los rellenos.....	137
4.4.2.2. Actividad acuosa (a_w) de los rellenos dulces	138
4.4.2.3 Textura y optimización de la formulación de los rellenos	139
Adhesividad y cohesividad	140
Firmeza, elasticidad y tiempo de relajación	141
Optimización de los rellenos.....	144
4.4.3 Conservación de los rellenos	147
4.4.3.1 Contenido de humedad, actividad acuosa y textura.....	147
4.4.3.2 Oxidación lipídica	149
4.4.3.3 Estabilidad de los antioxidantes	149
4.4.3.4 Ensayo microbiológico	150
4.5 CONCLUSIONES PARCIALES	152

Capítulo 5:Galletitas rellenas saborizadas

5.1 INTRODUCCIÓN	154
5.2 OBJETIVOS.....	155
5.3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	156
5.3.1 Ingredientes utilizados para la preparación de galletitas rellenas	156
5.3.2 Incorporación de saborizantes naturales a las galletitas	156
5.3.2.1 Contenido de antioxidantes en masas y galletitas.....	156
5.3.3 Producto final.....	157
5.3.3.1 Análisis sensorial del producto	158
5.3.3.2 Conservación de las galletitas rellenas	160
5.3.3.3 Valor nutricional y composición del producto final.....	162
5.3.4 Análisis estadístico	163
5.4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	164
5.4.1 Capacidad antioxidante de galletitas saborizadas	164
5.4.2 Análisis sensorial de galletitas rellenas saborizadas	165
5.4.3 Tiempo de conservación en el envase final.....	168
5.4.4 Valor nutricional y composición del producto final	171
5.4.4.1 Rótulo	172

Denominación de venta:.....	172
Lista de ingredientes:	173
Fecha de duración	174
Contenido neto de nutrientes	174
Información complementaria	175
5.5 CONCLUSIONES PARCIALES	177

Capítulo 6:Conclusiones Generales

6.CONCLUSIONES GENERALES	178
---------------------------------------	------------

Anexos y Referencias Bibliográficas

Anexo I	181
Anexo II	186
Anexo III	190
Referencias Bibliográficas	192

Capítulo 1

Introducción General



1.1 DIETA Y SALUD

En América Latina se ha observado un fuerte aumento en el consumo de alimentos ricos en azúcares y grasas; este hecho, sumado a la vida sedentaria actual, constituye un serio riesgo para la salud de la población (Uauy y Monteiro, 2004). La dieta es un factor clave para el control y desarrollo de enfermedades no transmisibles. La transición nutricional orientada a una dieta con gran densidad energética, un consumo relativamente elevado de alimentos con alto contenido de grasas saturadas, a lo que se agrega el escaso consumo de frutas, verduras, granos y cereales integrales, predispone a la aparición de factores de riesgo y enfermedades cardiovasculares, colesterol elevado, diabetes, ciertos cánceres, osteoporosis, sobrepeso y obesidad (Elgart y col., 2010; INDEC, 2013). Considerando el panorama mundial, la Organización Mundial de la Salud recomienda limitar la ingesta energética procedente de las grasas, sustituir los lípidos saturados por lípidos insaturados y eliminar los ácidos grasos *trans* de la dieta, todo esto siempre acompañado por ejercicio físico para un óptimo estado de salud (OMS, 2003).

Argentina no es ajena a esta problemática. En nuestro país las enfermedades crónicas no transmisibles (relacionadas además con el consumo del tabaco) son la principal causa de muerte (casi del 80 %) (Ministerio de Salud, 2011). Los resultados publicados por la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud (OMS) indicaron que las principales causas de decesos por enfermedades no transmitirlas en nuestro país son, las enfermedades cardiovasculares, seguidas por el cáncer (Figura 1.1).

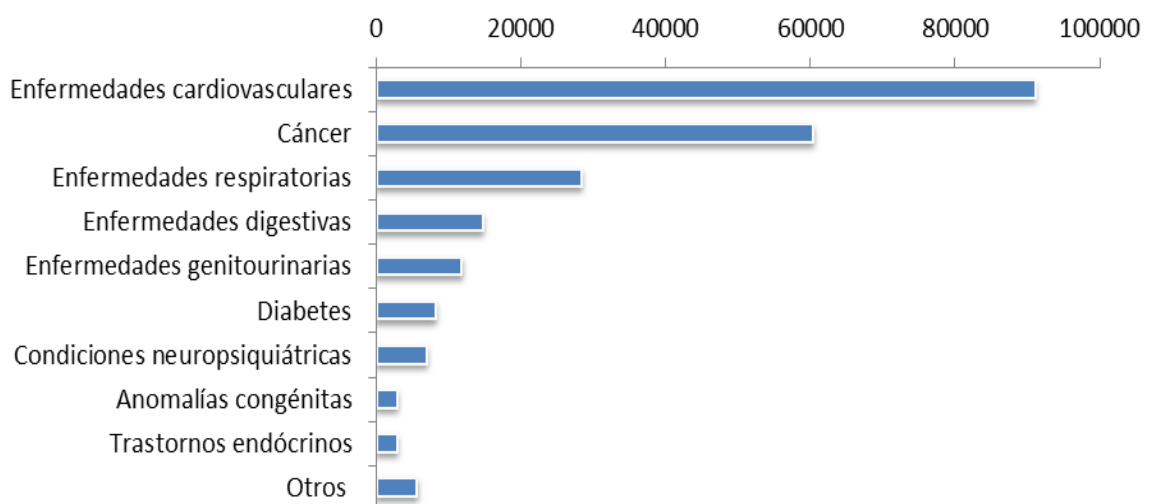


Figura 1.1. Descripción de las muertes por enfermedades no transmisibles en Argentina en el año 2014 (Adaptado de <http://www.paho.org/...>)

La alimentación saludable es fundamental para mantener una buena salud y mejorar la calidad de vida. Los patrones de consumo de los argentinos son pobres nutricionalmente, con

alimentos poco variados, centrándose en el consumo de trigo, carne vacuna, aceite de girasol y papa. En Argentina se consume menos de la mitad de las raciones recomendadas de verduras, frutas, leche, carnes varias (incluyendo carnes blancas), cereales, legumbres y aceites (Bär, 2010). En los últimos 40 años, las hortalizas, legumbres y frutas en la mesa argentina cedieron su espacio a los derivados de los cereales (harinas) y a los azúcares (Bär, 2016). Los resultados de la 3^{ra} encuesta nacional de factores de riesgo para enfermedades no transmisibles (INDEC; 2013) realizada sobre más de 32.000 personas, mostró que 6 de cada 10 presentaban exceso de peso (porcentaje significativamente mayor al registrado en el 2005). Además 2 de cada 10 de los encuestados presentaban obesidad, y entre quienes se realizaban análisis de sangre, 1 de cada 3 presentaban altos valores de colesterol, mientras que el 10 % presentaba diabetes o glucemia elevada. Finalmente, el 34 % de quienes se habían tomado la presión en los últimos 2 años presentaban altos valores de este indicador de riesgo (INDEC, 2013).

1.1.1 Alimentos con efectos beneficiosos para la salud

El incremento en la incidencia de las enfermedades crónicas no transmisibles y el aumento en el costo de manutención que ello conlleva, generaron que los países industrializados analizaran la posibilidad de combatirlas a partir de la dieta. Los nutricionistas se encargaron de este desafío y apoyaron la idea de la “Nutrición Óptima”, basándose en la ingesta de nutrientes y no nutrientes que favorecieran un buen estado de salud. A partir de este concepto, se desarrolló la idea de los alimentos funcionales, que tienen como finalidad optimizar las funciones fisiológicas de cada persona además de nutrirla (Ashwell, 2002).

El concepto de alimento funcional surgió en Japón, y luego se expandió hacia al resto del mundo. Expresa implícitamente que los alimentos y los componentes alimenticios pueden ejercer una influencia beneficiosa sobre las funciones fisiológicas al mejorar el estado de bienestar y salud, y reducir el riesgo de sufrir ciertas enfermedades. En los años noventa, el *International Life Sciences Institute* (Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, ILSI) con la financiación de la Comisión Europea (CE), elaboró un proyecto sobre alimentos funcionales conocido por sus siglas en inglés como FUFOSE (por “*Funcional Food Science in Europe*”, Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa). Este proyecto tuvo como objetivo desarrollar un enfoque científico para respaldar el desarrollo de los alimentos que podrían tener un efecto beneficioso sobre la salud. Luego de varios años de trabajo multidisciplinar, se elaboró el documento “Conceptos científicos sobre alimentos funcionales en Europa”, donde se incluyó la estrategia para la identificación y el desarrollo de los alimentos funcionales. Además se recomendaron dos tipos de alegaciones que podrían tener estos alimentos: “mejora de función” y “disminución de riesgo de enfermedad” (Action, 1999; Ashwell, 2002).

Según este documento (Leal, 2016):

“Un alimento puede ser considerado funcional si logra demostrar satisfactoriamente que posee efectos benéficos para la salud sobre una o más funciones del organismo – más allá de sus propiedades nutricionales habituales – en forma relevante para la salud y el bienestar y/o que reduzca el riesgo de alguna enfermedad” (Functional Food Science in Europe – FUFOS-ILSI EUROPA)”.

Los alimentos funcionales pueden ser aquéllos en los que (Ashwell, 2002):

- Alguno de sus componentes beneficiosos haya sido incrementado bajo condiciones especiales.
- Se haya incorporado algún componente beneficioso para la salud.
- Algún componente con efectos adversos sobre la salud haya sido eliminado o disminuido (por ejemplo la reducción de ácidos grasos saturados en ciertos alimentos).
- Alguno de los componentes haya sido modificado para generar un beneficio para la salud.
- La biodisponibilidad de alguno de sus componentes favorables para el estado de salud haya sido incrementada.

Es importante mencionar que el alimento funcional no es un comprimido ni una cápsula, debe ser un alimento y debe demostrar sus efectos en las cantidades en las que normalmente se lo consume como parte de la dieta (Leal, 2016). Debe producir efectos beneficiosos sobre las funciones orgánicas, además de sus efectos nutricionales intrínsecos. Además, la comprobación de estos efectos debe satisfacer las exigencias de la comunidad científica (Ashwell, 2002).

Existen varias funciones sobre las que estos alimentos han demostrado su efecto beneficioso sobre la salud, como la promoción de la salud cardíaca, efectos sobre el crecimiento y desarrollo en la primera infancia, reguladores metabólicos, promotores de la salud intestinal y defensa contra el estrés oxidativo.

1.1.1.1 Promotores de la salud cardíaca

Las enfermedades cardiovasculares (CVD) son una de las principales causas de muerte en países industrializados, y constituyen un problema de creciente importancia en los países en vías de desarrollo. Particularmente, en nuestro país es la principal causa de muerte: sobre un total de 300.000 muertes anuales, casi 100.000 son por enfermedades cardiovasculares (Ministerio de Salud, 2016).

El control de la arteriosclerosis a partir de la dieta representa la base de la prevención de las CVD. Esta enfermedad se caracteriza por el estrechamiento de las arterias por formación de ateromas, pudiendo progresar hasta la oclusión completa del vaso (Abejón, 2010). Las consecuencias de estas lesiones dependen del grado de las mismas y de su ubicación: las lesiones de las arterias coronarias ocasionan enfermedad coronaria, las lesiones en las arterias cerebrales pueden causar enfermedad cerebral como el ACV, mientras que ateromas en las arterias ilíaca y femoral o aorta pueden causar un dolor isquémico en las extremidades, gangrena o aneurisma (Tribble y Krauss, 2003).

Las lesiones iniciales de la arteriosclerosis se caracterizan por la presencia de células cargadas de lípidos (células espumosas) en la túnica íntima arterial. Estas células espumosas derivan de los macrófagos y de células de músculo liso que absorben lipoproteínas plasmáticas con contenido de grasa y colesterol (Tribble y Krauss, 2003).

Si bien esta patología es de un origen complejo, es globalmente aceptado que niveles altos de colesterol plasmático constituyen un importante indicador de riesgo (Valenzuela y Ronco, 2004). El colesterol ingerido es absorbido por las células intestinales y es esterificado. Por su naturaleza lipofílica, el colesterol sólo puede ser transportado por sangre a través de lipoproteínas. Éstas se clasifican por su densidad en quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), LDL (lipoproteínas de baja densidad) y HDL (lipoproteínas de alta densidad). Cada una de estas lipoproteínas tiene una función específica; así, la fracción LDL, llamada vulgarmente “colesterol malo”, corresponde al colesterol de “oferta” a los tejidos, mientras que las HDL corresponden al colesterol que se está encaminando a su eliminación por el hígado (“colesterol bueno”). Una cantidad elevada de LDL en plasma condiciona un mayor riesgo a sufrir aterogénesis (Delplanque y col., 2001).

Entre los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular que dependen de la dieta se incluye un alto consumo de ácidos grasos *trans* industriales, ácidos grasos saturados y colesterol: se ha observado que todos los ácidos grasos saturados, a excepción del ácido esteárico (18:0), promueven en mayor o menor medida un aumento del colesterol total y del colesterol LDL, y en menor proporción del colesterol HDL. Por otra parte, los ácidos grasos *trans* poseen efecto hipercolesterolémico, con marcada disminución del colesterol HDL. Afortunadamente, existen componentes alimenticios que se consideran beneficiosos para combatir estas enfermedades. La fibra dietaria presenta efectos antihipercolesterolémicos, mientras que el consumo de ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico y el ácido oleico son efectivos para disminuir los niveles de colesterol plasmático (Delplanque y col., 2001; Tribble y Krauss, 2003).

Una dieta rica en antioxidantes también disminuye el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. El exceso de radicales libres está involucrado en distintas fases de la formación de la placa de ateroma: La formación de la placa arteriosclerótica se inicia con la captación de las LDL por los macrófagos, que se transforman en células espumosas. Las LDL oxidadas van a tener mayor poder aterogénico, ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica (Gui y Amenós, 2000).

Las etapas por las que se desarrolla este proceso son las siguientes (Figura 1.2):

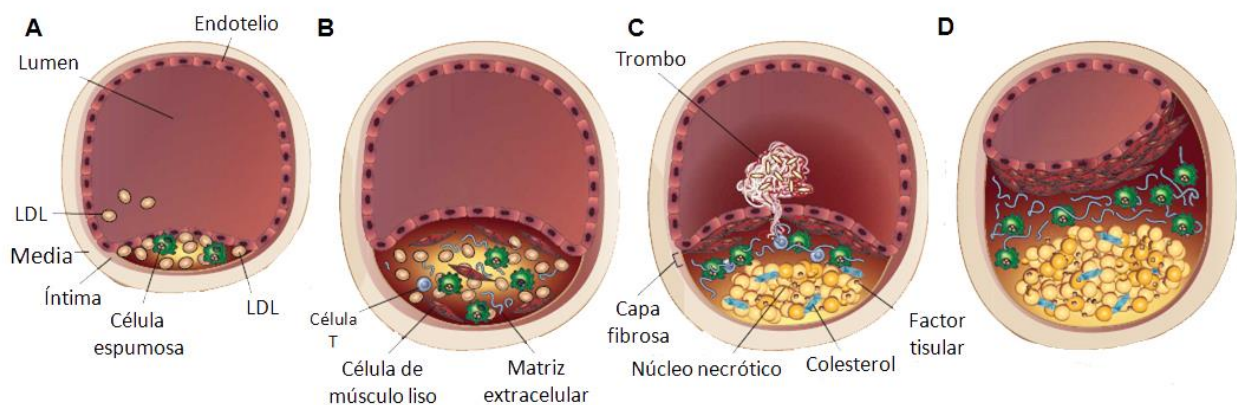


Figura 1.2. La lesión comienza con una estría grasa (A), puede convertirse en una lesión intermedia (B) y luego en una lesión vulnerable a la ruptura (C) (derivando en coágulos) y, de no romperse, en una lesión obstructiva avanzada (D) que puede resultar en la oclusión del vaso e impedir el flujo de sangre (Adaptado de Rader y Daugherty, 2008)

- **Formación de la estría grasa:** Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) entran en la íntima, donde experimentan modificaciones oxidativas (formación de las LDLox) debido a la exposición continua a especies reactivas de oxígeno, y por una baja concentración de antioxidantes (Abejón, 2010). Las LDLox se agregan en el espacio intimal incrementando su internalización a los macrófagos por fagocitosis. Esta incorporación de las LDLox por los macrófagos deriva en la formación de células espumosas cargadas de lípidos (Rader y Daugherty, 2008). La acumulación de células espumosas conduce a la formación de estrías grasas que se pueden encontrar tanto en los vasos sanguíneos adultos como de niños. Si bien esta lesión no genera ningún tipo de trastorno funcional, se considera que son el desencadenante de patologías arterioscleróticas más complejas.

- **Engrosamiento difuso de la íntima:** La presencia de células del músculo liso en la íntima reclutadas desde la media contribuyen al proceso, segregando compuestos extracelulares como colágeno. La presencia de estos compuestos incrementa la retención y agregación de las LDL. Además de monocitos, otros tipos de leucocitos, particularmente células

T, son reclutados hacia la lesión y ayudan a perpetuar el estado de inflamación crónica (Rader y Daugherty, 2008). Esta es la etapa donde más suelen aparecer los accidentes oclusivos, y la que más se beneficia de la angioplastia, porque esa íntima engrosada y las eventuales placas o depósitos son blandos y friables y se dejan “aplastar” por el balón de angioplastia, pudiendo restablecer el flujo.

- Formación de la placa fibrosa: las células espumosas eventualmente mueren liberando desechos celulares y colesterol. Las células del músculo liso forman la placa fibrosa por debajo del endotelio. Este proceso contribuye a la formación de un núcleo necrótico dentro de la placa y promueve el reclutamiento de las células inflamatorias. Esta placa obstructiva puede romperse resultando en una exposición del material trombogénico, con la eventual formación de un coágulo o trombo (Rader y Daugherty, 2008).

- En el caso de que la placa no se rompa, la lesión puede crecer hasta invadir el lumen y resultar en una enfermedad clínicamente obstructiva. Esta placa está endurecida y no se beneficia con la angioplastia.

1.1.1.2 Crecimiento y desarrollo en la primera infancia

El embarazo y los primeros meses de vida son períodos críticos del crecimiento que producen efectos tanto a corto como a largo plazo en las funciones orgánicas. El correcto desarrollo de las funciones metabólicas, de comportamiento y riesgos de mortalidad en general, pueden verse directamente afectados por la nutrición en la primera infancia. Existen distintos componentes alimenticios, como las vitaminas antioxidantes o los probióticos, que presentan efectos beneficiosos sobre la respuesta inmunitaria. Por otro lado, el efecto combinado del calcio con otros constituyentes, como el fósforo y microelementos como el magnesio y el zinc, así como las vitaminas D y K, podría aumentar el crecimiento óseo en las etapas tempranas de desarrollo y adolescencia, lo que se traduciría en una menor incidencia de osteoporosis (Ashwell, 2002).

1.1.1.3 Reguladores metabólicos

Una alimentación equilibrada influye en todos los procesos metabólicos y fisiológicos. Ciertos alimentos, como algunos tipos de almidón o fibra alimentaria, pueden regular la velocidad de absorción de glucosa, disminuyéndola y/o logrando que las fluctuaciones de su concentración sean menos pronunciadas, disminuyendo la necesidad de insulina. Otros tipos de alimentos reguladores son aquéllos de “índice glucémico bajo”, como el pan integral o la avena, que sólo producen un aumento gradual de la glucosa en sangre al ser consumidos (Ashwell, 2002).

Por otro lado, productos como la canela, han demostrado ser eficaces en el control de la glucemia, ya que pueden actuar como un mimético de la insulina potenciando su acción o estimulando el metabolismo celular (Gruenwald y col., 2010).

1.1.1.4 Promotores de la salud intestinal

El intestino grueso contiene un ecosistema microbiano extremadamente complejo. La flora del colon se desarrolla inicialmente a partir del consumo de la leche materna y del ambiente. En los lactantes alimentados con leche materna la flora está dominada por bifidobacterias. A lo largo de la vida esta flora se va modificando, y en la adultez las especies más comunes en el colon pertenecen a los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Eubacterium* (Ashwell, 2002).

Los distintos componentes de la microflora colónica mantienen un delicado equilibrio. Algunas bacterias como las bifidobacterias y los lactobacilos se consideran beneficiosas, mientras que otras se consideran benignas (como algunos tipos de eubacterias). Estos dos grupos impiden el crecimiento de un tercer grupo de bacterias, bacterias nocivas para la salud, como el *Clostridium difficile* o bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Ashwell, 2002).

Entre las estrategias utilizadas para promover un equilibrio saludable de la microflora intestinal, se encuentran los prebióticos y los probióticos (o su combinación, los simbióticos). Estos alimentos funcionales pueden proveer un beneficio al sistema digestivo, que suele obtenerse mediante el incremento de las cantidades de bifidobacterias, de lactobacilos, o de ambos (Ashwell, 2002).

Por definición, un probiótico es un ingrediente alimenticio microbiano vivo que, ingerido en cantidades suficientes, produce efectos benéficos en la salud del consumidor (Ashwell, 2002; Anderson y col., 2009). Por otro lado, los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles de los alimentos que afectan de manera positiva al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de cepas que se consideran benéficas para su salud (Olagnero y col., 2007). En general los prebióticos de uso más extendido son los oligosacáridos, o fibra soluble de bajo peso molecular, de distintos tipos (fructo, galacto, xiloligosacáridos, etc.) así como otras sustancias como la lignina, el almidón resistente, los polialcoholes y las pirodextrinas (Anderson y col., 2009; Saura Calixto, 2010).

1.1.1.5 Defensa contra el estrés oxidativo

El oxígeno es esencial para la vida humana. Sin embargo, paradójicamente, interviene en numerosas reacciones nocivas para el organismo. La toxicidad de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) radica en que actúan como oxidantes, y se cree que

son las causantes del envejecimiento, de enfermedades como el cáncer, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades degenerativas del sistema nervioso como el Parkinson y el Alzheimer (Ashwell, 2002).

El cuerpo humano posee distintos mecanismos, enzimáticos y no enzimáticos, para protegerse de las sustancias reactivas de oxígeno responsables del daño oxidativo. En primer lugar, enzimas como la glutatión peróxidasa, la superóxido dismutasa o la catalasa, juegan un rol fundamental en la defensa del organismo contra agentes oxidantes. La nutrición es también esencial para mantener este sistema de defensas ya que, por ejemplo, minerales como el selenio, el magnesio y el zinc están involucrados en la estructura y la actividad catalítica de estas enzimas. Por otro lado, una segunda línea de defensas naturales la conforman moléculas con capacidad antioxidante como el glutatión, y vitaminas como la E y la C (Guerra, 2001).

Sin embargo, si el cuerpo está expuesto a un nivel de prooxidantes superior a los niveles en que pueden actuar los antioxidantes, se genera un desbalance conocido como “estrés oxidativo”, que puede derivar en distintas complicaciones para la salud, como trastornos neurodegenerativos, aterogénesis y cáncer. Esta situación puede ser compensada y contrarrestada por un consumo de alimentos con alto contenido de antioxidantes. Éstos pueden bloquear los efectos de las especies reactivas de oxígeno que conducen a la destrucción de células, contribuyen a la formación de la placa aterogénica y generan daños en el ADN (Langner y Rzeski, 2014). Es por esto que actualmente en la industria alimentaria existe una creciente demanda por productos saludables que contengan antioxidantes.

Los antioxidantes se pueden clasificar según su mecanismo de acción en antioxidantes de tipo I y de tipo II. Los antioxidantes de tipo I son aquéllos que se unen a radicales libres (por ejemplo: ROO^\bullet) para formar compuestos no radicalarios que detienen el proceso oxidativo. Un ejemplo de este tipo de antioxidantes son los compuestos fenólicos sustituidos o los tocoferoles, que son capaces de generar radicales estables por resonancia y poco reactivos (Pisoschi y Negulescu, 2012; Lupano, 2013) (Figura 1.3).

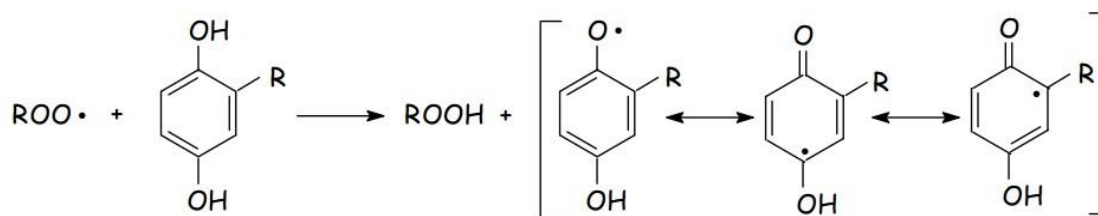


Figura 1.3. Estabilización por resonancia de un radical de antioxidante de tipo I
(Adaptado de Lupano, 2013)

Los antioxidantes de tipo II son compuestos que pueden retardar o inhibir la oxidación evitando que se formen los radicales libres. Existen múltiples mecanismos por los que estos

antioxidantes actúan, por ejemplo desactivando el oxígeno singulete (que inicia la oxidación lipídica) o por su efecto complejante de metales, que actúan como prooxidantes. Entre los quelantes más utilizados están el ácido cítrico y el EDTA (Pisoschi y Negulescu 2012; Lupano, 2013).

En los últimos años se han estudiado distintos componentes de la dieta que pueden reforzar las defensas antioxidantes del organismo, como las vitaminas E y C, los carotenoides y los polifenoles, incluidos los flavonoides. Estos componentes pueden encontrarse en gran cantidad de alimentos como la miel, las especias y otros alimentos de origen vegetal. Además existen compuestos derivados del pardeamiento no enzimático que también han presentado una importante capacidad antioxidante:

- **Productos derivados de la reacción de Maillard**

La reacción de Maillard involucra la interacción entre grupos amino de las proteínas con grupos carbonilo, fundamentalmente de hidratos de carbono con capacidad reductora (Van Boekel, 1998). Las melanoidinas, formadas en las últimas etapas, parecen ser los compuestos con mayor actividad antioxidante, la que se ha relacionado con la capacidad de quelar metales de transición y atrapar radicales libres (Morales y col., 2009; Wang y col., 2011). Entre otros efectos beneficiosos para la salud que presentarían los compuestos de Maillard se incluyen la inhibición del crecimiento de tumores, efectos prebióticos e incluso antihipertensivos.

- **Miel**

La miel contiene gran variedad de compuestos fenólicos que se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química en no-flavonoides (derivados del fenol) y flavonoides (flavonas, isoflavonas y chalconas). El interés particular en estos compuestos es su acción como antioxidantes, ya que captan radicales libres inhibiendo la peroxidación lipídica (da Silva y col., 2016). Además se ha sugerido que la presencia de compuestos fenólicos en la miel tiene una estrecha relación con sus propiedades beneficiosas para la salud como las propiedades anticancerígenas, anti-inflamatorias, antiaterogénicas, antitrombóticas, y la modulación de la respuesta inmune (Estevinho y col., 2008).

- **Saborizantes naturales**

Hay saborizantes como las hierbas y las especias, que además de su acción saborizante han demostrado ser capaces de inhibir los radicales libres (Chan y col., 2011; Lu y col., 2011; Emboscado, 2015). Existen ciertas limitaciones a la hora de seleccionar este tipo de antioxidantes, ya que al aportar sabor en el producto no pueden ser utilizados indistintamente para cualquier alimento. El romero, el orégano, la salvia o la pimienta, son algunos ejemplos de saborizantes utilizados habitualmente para la formulación de alimentos salados. Por otro lado, el

jengibre, la canela o el chocolate son ejemplos de saborizantes con una importante capacidad antioxidante, que se podrían utilizar en productos dulces. Se han demostrado múltiples efectos de la canela, como la actividad antitumoral y antimutagénica asociada a la presencia de ciannamaldehído (Jakhetia y col., 2010). Por otro lado, el consumo de chocolate reduciría la oxidación de las LDL y aumentaría las defensas antioxidantes en plasma, beneficiando la salud cardiovascular. Este producto es rico flavonoides como las catequinas y procianidinas que, además de sus efectos antioxidantes, también han demostrado efectos benéficos sobre la presión arterial (Afoakwa, 2016).

1.1.2 Normativa y marco legal

A causa de la importancia que los alimentos funcionales están adquiriendo, muchos países han comenzado a desarrollar una normativa legal para enmarcarlos. Aunque estos alimentos no se encuentran actualmente definidos como una categoría en ninguna legislación internacional, países como Brasil, el Reino Unido, los Estados Unidos y Australia permiten que se incluyan ciertas declaraciones de propiedades saludables en su rótulo.

En nuestro país existen en el mercado alimentos funcionales, pero los criterios para autorizar las leyendas no son uniformes. La inclusión de dichas inscripciones es aún una materia controvertida. Actualmente el INAL-ANMAT (Argentina) está realizando un relevamiento de la legislación internacional, para sancionar una norma que permita unificar los criterios (ANMAT, 2016). La CONAL se encuentra estudiando una propuesta de incorporación del Art. 236 al Capítulo V del Código Alimentario Argentino (CAA) (CAA, 2013^a), referido a las declaraciones de propiedades saludables, que fue presentada por la Coordinadora de las Industrias de Productos Alimenticios (COPAL) en marzo de 2009 (Moreno, 2012). Cabe aclarar que actualmente en el CAA se ha prohibido incorporar en el rótulo información que pueda referirse al consumo de los alimentos con fines beneficiosos para la salud:

Artículo 235 - (Res. Conj. MSyA 149/05 y SAGPyA 683/05) "En los rótulos o anuncios, por cualquier medio (propaganda radial, televisiva, oral o escrita) queda prohibido efectuar indicaciones que se refieran a propiedades medicinales, terapéuticas o aconsejar su consumo por razones de estímulo, bienestar o salud"

Por otro lado, el ministerio de Salud de la Nación, en su documento fechado el 14 de noviembre 2011 (Disposición 7730), considerando que *"Existe suficiente evidencia científica que demuestra que una alimentación saludable es parte fundamental de la promoción de la salud"*, y que *"El enfoque de la salud pública hacia la prevención primaria es considerado el curso de acción más favorable desde la relación costo beneficio alcanzable y sostenible para poder*

luchar contra la epidemia mundial de enfermedades crónicas no trasmisibles”, dispuso sancionar la “Guía para la presentación y evaluación científica de declaraciones de las propiedades saludables de alimentos”. En ella quedan explicitadas las directrices a aplicar sobre toda publicidad o propaganda dirigida al público en general. En la reglamentación se incluye que para incorporar una declaración de propiedades saludables es necesario anexar una copia completa de estudios científicos en humanos y otros estudios (“in vivo”, “in vitro” y “ex vivo”) que avalen la declaración. Este documento establece que “Sólo podrán incluirse declaraciones de propiedades saludables” y que “En la publicidad o propaganda de productos alimenticios sólo podrá incluirse la información nutricional complementaria (CLAIMs) (...) relacionada con la declaración de propiedades saludables que se autoricen en el marco de la normativa vigente, pero no podrá hacerse ninguna referencia o mención a condiciones anormales o patológicas” (Disposición ANMAT N° 4980/2005 con las modificaciones de la Disp. ANMAT N° 7730/2011) (ANMAT, 2011)

1.2 PRODUCTOS DE PANADERÍA

Los productos de panadería constituyen una de las principales fuentes de hidratos de carbono en la dieta occidental. En la Argentina, la mayor parte de las calorías de cereales en nuestro plato provienen de panificados dulces o salados, galletitas, pizzas, tartas y pastas (Bär, 2010).

Los productos de panadería son extremadamente versátiles. Es posible incorporar distintos ingredientes a su formulación con el objetivo de obtener beneficios para la salud del consumidor. Aunque es más tradicional la comercialización de productos lácteos “saludables”, la posibilidad de los panificados como alimentos con efectos benéficos constituye un mercado en pleno desarrollo, ya que proveen una matriz ideal, y el producto puede ser fácilmente suministrado al consumidor (Siro y col., 2008).

Se han desarrollado panes con baja respuesta glucémica, con elevada capacidad antioxidante (por medio de la adición de distintos ingredientes con alto poder antioxidante como orégano, ajo, cebolla, etc.), y panes con perfil lipídico modificado (aumentando su contenido de ácidos grasos poliinsaturados al incorporarles aceites de pescado desodorizado o frutos secos) (Araya y Alviña, 2009). Otros estudios han apuntado a la incorporación de productos del café para enriquecer pan, obteniendo una mayor quimio-protección y anti-genotoxicidad *in vitro*; y también se ha evaluado la incorporación de β -glucano o inulina en panes (Glei y col., 2006; Hager y col., 2011). Otros trabajos se han centrado en panificados dulces, como los muffins: Soong y col (2014; 2015) evaluaron la incorporación de harina de arroz, maíz, avena y cebada sobre estos panificados. Estos autores encontraron que los muffins preparados con cebada

presentaban el menor índice glucémico *in vivo*, y también presentaban el mayor contenido de compuestos fenólicos, que se relacionaron directamente con el nivel de antioxidantes en el producto final. Quílez y col. (2006) evaluaron la incorporación de fitoesteroles, α -tocoferol y β -caroteno como ingredientes funcionales en croissants y muffins españoles (magdalenas), y concluyeron que la incorporación de estos ingredientes a la formulación no modificaba las características sensoriales de los panificados estudiados.

1.2.1 Galletitas

En general las galletitas disponibles en el mercado son altamente calóricas, y en muchos casos contienen aditivos que pueden provocar problemas en la salud de los consumidores, como manifestaciones cutáneas (ej. urticaria) por presencia de antioxidantes y colorantes artificiales (Serrano y col., 2006). Es por esto que, en general, el mercado no considera que un alimento como las galletitas pueda ser saludable ni funcional; en este aspecto presentan mejor aceptabilidad los alimentos como el pan y las pastas (Dean y col., 2007). Sin embargo, existen numerosos trabajos en donde se han desarrollado galletitas con diversos efectos beneficiosos sobre la salud. Estudios previos han demostrado buena aceptación de galletitas saludables en las que los niveles de sal y azúcar se disminuyeron (Boobier y col., 2006). Boobier y col. (2007) incorporaron vitamina B12, ácido fólico, vitamina C y fibra prebiótica a una formulación de galletitas estándar, a la vez que redujeron el contenido de sal y azúcar en el producto final. Sus resultados mostraron que mediante el consumo del producto obtenido se podía reducir el nivel de distintos indicadores de riesgo cardiovascular en personas sanas. También se ha evaluado la incorporación de harina de trigo sarraceno como ingrediente funcional (por su perfil de aminoácidos y por poseer un alto nivel de compuestos fenólicos) de esta manera se puede conseguir un producto panificado con una buena capacidad antioxidante y una buena aceptabilidad sensorial (Sedej y col., 2011). Otros trabajos se han centrado en modificar el perfil lipídico de las galletitas al incrementar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados incorporando algas (*Isochrysis galbana*) o aceites marinos (Gouveia y col., 2008; Kadam y Prabhasankar, 2010). La incorporación de productos con efecto prebiótico en galletitas también ha sido estudiada *in vivo* al agregar goma guar parcialmente hidrolizada o fructooligosacáridos (Tuohy y col., 2001). Los voluntarios que habían consumido las galletitas con prebióticos en este estudio, presentaron un incremento en la población de bifidobacterias fecales comparados al grupo placebo (Tuohy y col., 2001). Otros trabajos, en cambio, han encontrado excelentes resultados al utilizar subproductos de la industria alimentaria ricos en fibra para incorporar en galletitas, como la cáscara del mango, cáscaras de café o subproductos de la industria cervecera (Öztürk y col., 2002; Ajila y col., 2008; Gupta y col., 2010; Garcia-Serna y col., 2014).

Actualmente la industria de las galletitas es extremadamente extensa y dispone de infinidad de productos, los cuales se diferencian principalmente en su composición. Las galletitas se pueden clasificar según su dureza y textura, según el método de producción (fermentadas, laminadas, etc.) o según su formulación, de acuerdo a la cantidad de grasa y azúcar. Existe una fuerte relación entre la estructura y la cantidad de grasa y azúcar utilizada para preparar las galletas (Manley, 2000). Las grasas promueven la formación de una estructura más blanda que se funde en la boca, mientras que el agregado de azúcar otorga fragilidad al producto, ya que interfiere con la red de gluten (Conforti, 2009). Utilizando esta clasificación podemos diferenciar galletitas de agua, galletitas cremosas, semi dulces, duras, etc., tal como se ve en la Figura 1.4.

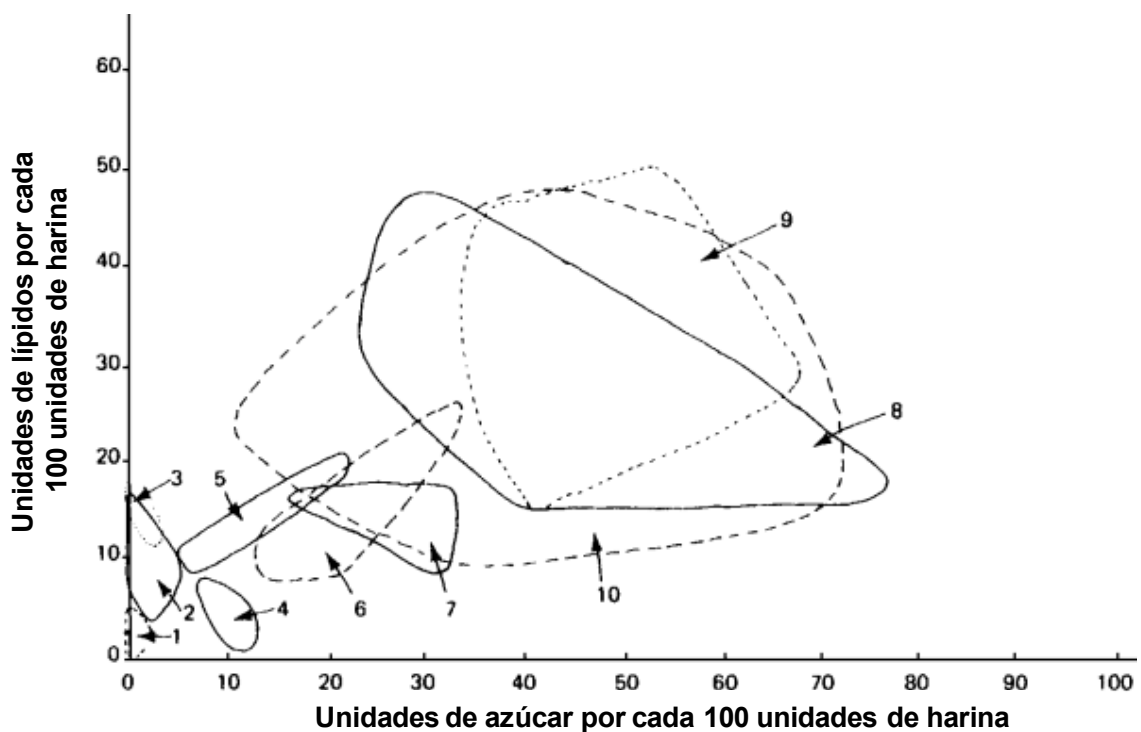


Figura 1.4. Relación entre cantidad de azúcar y grasa en la formulación de productos a base de haria: 1 Pan, pizza y pan de centeno, 2 galletas de agua y crackers sodadas, 3 crackers de crema, 4 galleta tipo "cabin biscuit", 5 crackers saborizadas, 6 galletas semidulces, 7 semidulces continentales, 8 galletas de masa corta (moldeadas), 9 galletas cortadas con cortante, 10 galletas laminadas (adaptado de Manley, 1983)

Cada una de estas galletas presenta características distintivas de acuerdo a su formulación. Las galletitas tipo "crackers" se preparan a partir de recetas simples mezclando harina y agua con una porción de grasa, este es el caso del "Matzá" o de las galletitas de agua (aunque en para estas últimas existen algunas recetas que incluyen sal, azúcar y/o extracto de malta). Este tipo de galletitas presentan superficies rugosas de textura crujiente. Las galletas de crema en cambio, son productos de textura generalmente suave y con bajos niveles de azúcar.

Sus niveles de humedad rondan el 4 % y son susceptibles a la oxidación lipídica durante su tiempo de conservación, por su alto nivel de lípidos. Por otro lado, las galletas de masa corta, presentan una alta proporción de grasa y azúcar, y una baja cantidad de agua lo que genera un gluten poco desarrollado y una masa con poca elasticidad que se rompe fácilmente. Las galletitas semidulces, en cambio, poseen una alta proporción de proteínas de harina en comparación a su bajo nivel de lípidos y azúcar. Esto genera un producto de una textura más dura que productos similares que se encuentran habitualmente en el mercado (Manley, 2000).

Como se explicó previamente, el exceso de lípidos en la dieta está asociado a obesidad, altos niveles de colesterol en sangre y enfermedades cardíacas, mientras que el alto nivel de azúcar es considerado uno de los principales responsables de la diabetes, la obesidad y las enfermedades dentales (Pareyt y col., 2009). Es por esto que en el presente trabajo se apuntó a disminuir el contenido de azúcar refinada y lípidos (en particular ácidos grasos saturados) en la formulación de galletitas, a la vez que se buscó incrementar el contenido de antioxidantes en el producto. De esta manera se buscó desarrollar un producto más saludable que los que ofrecen las principales marcas del mercado. La reducción de azúcar y grasa en la formulación de galletitas representa grandes dificultades tecnológicas, ya que estos componentes no sólo son determinantes del sabor (Drewnowski y col., 1998) sino también de la textura y la calidad del producto final.

1.2.2 Galletitas rellenas

La incorporación de rellenos a las galletitas (al igual que el recubrimiento) es un proceso secundario que se realiza una vez que las galletas (o “tapas”) se han enfriado. Este proceso permite una mayor variedad de productos (Figura 1.5).



Figura 1.5. Distintos tipos de galletitas rellenas que se pueden encontrar en el mercado: rellenas con limón (A), crema de vainilla (B), chocolate (C) y crema de frutilla (D)

La formulación de los rellenos es extremadamente versátil: se pueden utilizar distintos ingredientes y luego adicionar saborizantes, aromatizantes y/o colorantes para obtener un producto final de las características deseadas. Sin embargo, en general los principales constituyentes de los rellenos dulces son el azúcar refinado y una fase grasa (que puede ser un shortening, manteca de cacao o productos similares) (Manley, 2000). En las cremas de relleno (al igual que en las cubiertas de galletitas), las grasas proporcionan una buena textura y sabor al paladar (Lezcano, 2011).

En cuanto a la producción, en un principio, la crema en las galletitas tipo sándwich se adicionaba manualmente a las tapas, aunque hoy en día existen máquinas especializadas para esta labor (Figura 1.6).

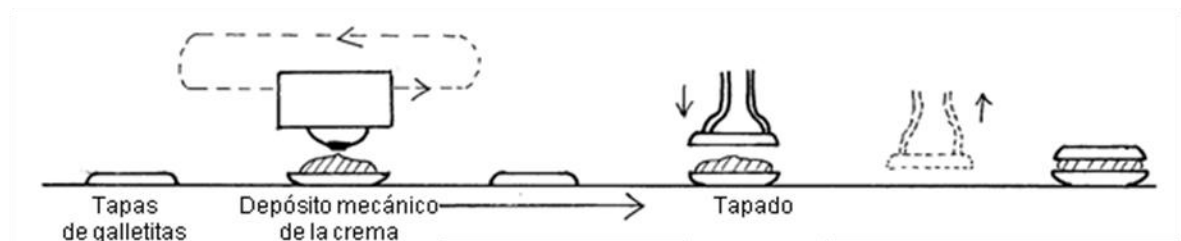


Figura 1.6. Secuencia para la preparación industrial de galletitas tipo sándwich mediante el proceso de depósito y tapado (adaptado de Manley, 2000)

En el proceso de depósito y tapado, que se puede observar en la Figura 1.6, la crema debe ser colocada sobre la galletita utilizando una tolva que funciona como una manga mecánica. Este recipiente debe encontrarse a una temperatura levemente más alta que la crema para evitar que la misma se adhiera a las paredes. Luego, una vez que la crema es depositada sobre la base de la galleta, la máquina coloca la tapa superior. Para que este proceso sea exitoso, la temperatura de la crema debe ser controlada, de manera que ésta sea lo suficientemente fluida como para poder cubrir la base de la galleta, pero no demasiado para que no escurra por los bordes. Luego, al enfriarse, el relleno debe ser capaz de mantener la estructura de la galletita, mientras que al ser consumido debe fundirse rápidamente para poder liberar los sabores retenidos en la matriz. Es por esto que se recomienda el uso de la manteca de cacao (o alguna fase grasa con características similares), ya que ésta cumple con los requisitos (Manley, 2000).

1.2.3 Mercado de las galletitas en Argentina

Argentina es uno de los principales consumidores de galletitas en el mundo. Un estudio realizado por la consultora Kantar Worldpanel a nivel nacional durante abril del año 2015 mostró

que las galletitas dulces son uno de los cuatro alimentos más consumidos en los hogares argentinos (<http://www.telam.com.ar...>, 2015).

Las empresas de galletitas en Argentina tienen una fuerte presencia a nivel regional; éstas están centralizadas principalmente en la provincia de Buenos Aires, y entre los años 2005 y 2014 han mostrado un importante crecimiento. Puntualmente, la producción de galletitas creció un 72,3 % durante estos años (Figura 1.7) (Lezcano, 2015).

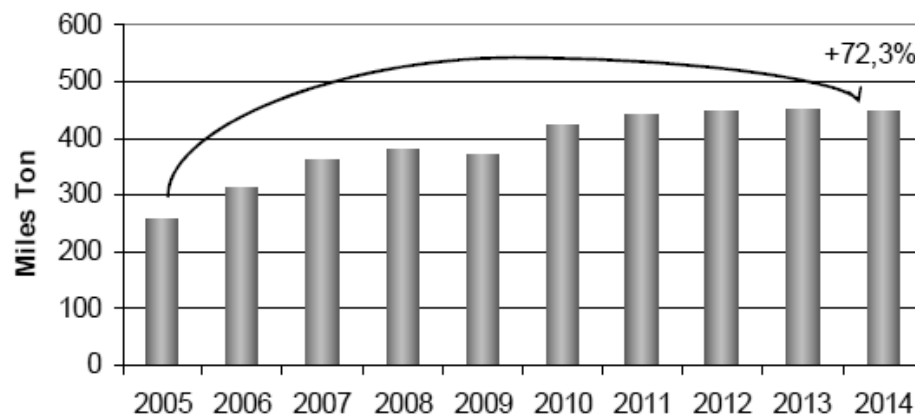


Figura 1.7. Producción de galletitas y bizcochos en la Argentina entre los años 2005 y 2014 (Adaptado de Lezcano, 2015)

Por otro lado, la tasa de consumo aparente de galletitas y bizcochos (cantidad total de las entregas de un producto en un país, más las importaciones deduciendo las exportaciones) durante el período 2005 - 2014 presentó también un incremento interanual del 79,9 % (Figura 1.8).

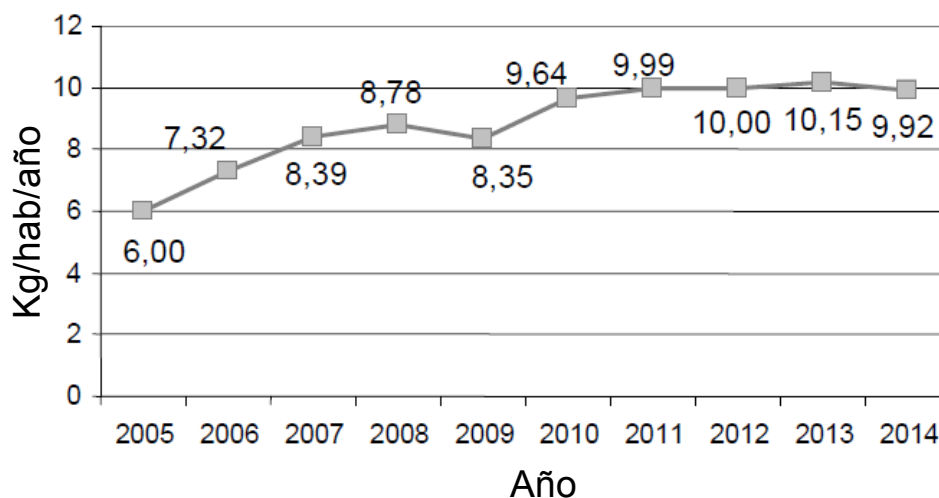


Figura 1.8. Consumo *per capita* de galletitas y bizcochos en la Argentina entre los años 2005 y 2014 (Adaptado de Lezcano, 2015)

El consumo *per capita* ha mostrado un crecimiento con una tasa media anual del 13,5 %, y se calcula que en 2014 el consumo galletitas y bizcochos se aproximó a los 10,7 Kg/hab./año, muy superior al de otros países (el consumo de galletitas en Estados Unidos es de 7 Kg/hab./año, mientras que en países latinoamericanos como Brasil o México el consumo es de 6,05 y 4,75 Kg/hab./año, respectivamente) (Lezcano, 2015).

Estos datos indican la importancia de las galletitas en la dieta argentina actual. Según Romina Broda, Directora de la Categoría Galletas de la multinacional Mondelez International Cono Sur "Las galletitas son consideradas como un alimento que ocupa un lugar muy importante en todas las comidas, es por esto que la penetración de estos productos en los hogares es del 97 %" (Broda, 2014). Según E. Lezcano (2006) las galletitas se caracterizan por su consumo cotidiano y familiar, así como su buena aceptación, por lo que forman parte de los hábitos de compra de los consumidores argentinos, comparándose con productos de la canasta básica como la carne o la leche.

Actualmente en la Argentina están registrados más de 200 tipos distintos de galletitas dulces y aproximadamente 130 tipos de galletitas saladas (incluyendo las de agua y las de arroz) (Vademécum Nutrinfo, 2016). Sin embargo, la estrecha asociación entre los hábitos de consumo y el tipo de galletitas genera limitaciones a la hora de innovar en este tipo de productos. Los consumidores de galletitas demandan nuevos alimentos (productos saludables, dietéticos, de conveniencia, etc.) pero que no sean demasiado diferentes a los que consumen tradicionalmente, fenómeno conocido como *inercia del consumo alimentario* (Acuña y Petrantonio, 2003).

Considerando todo esto seleccionamos las galletitas como nuestro objeto de estudio dado que por su facilidad de consumo, su larga vida útil, su precio relativamente bajo y la aceptabilidad global que tienen, constituyen una buena alternativa también para desarrollar un nuevo producto más saludable pero con características similares a los encontrados en el mercado, de modo de asegurar una buena aceptación de parte de los consumidores.

Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo fue desarrollar una galletita rellena de buena aceptabilidad, más saludable que otros productos equivalentes encontrados habitualmente en el mercado y con un alto contenido en antioxidantes tanto en las tapas como en los rellenos.

Objetivos abordados en cada capítulo

Capítulo “Galletitas”

Desarrollar una tapa de galletita de prolongada vida útil y un alto contenido de antioxidantes generados durante el horneado (vía reacción de Maillard) utilizando una formulación con un reducido contenido de azúcar refinada y con lípidos de origen vegetal.

Capítulo “Mieles y rellenos”

Incorporar miel con alto contenido de antioxidantes a la formulación de rellenos de galletitas en reemplazo parcial de la fase grasa y del azúcar refinado.

Capítulo “Galletitas rellenas saborizadas”

Evaluar la incorporación de saborizantes naturales con poder antioxidante a la formulación de galletitas. Comprobar la aceptabilidad y vida útil del producto en su envase final.

Capítulo 3

Galletitas



3.1 INTRODUCCIÓN

Las galletitas son un sistema alimentario complejo. Durante el proceso de horneado, tanto en galletitas como en panes ocurren cambios físicos y químicos, que van a dar lugar al producto final.

En las galletitas uno de los objetivos del horneado es disminuir la humedad del producto para asegurar una prolongada vida útil, se desprenden los gases de los leudantes químicos, y las burbujas se expanden quedando parcialmente retenidas en la estructura de la masa. También durante el horneado ocurre el pardeamiento no enzimático, que genera que la galletita adquiera su color dorado característico. Sin embargo, luego, durante el almacenamiento, su calidad puede disminuir a causa de la absorción de humedad o por deterioros químicos como la oxidación lipídica.

3.1.1 Preparación de las galletitas: Ingredientes

3.1.1.1 *Harina de trigo*

Por harina de trigo se entiende el producto obtenido de la molienda del endosperma del grano de trigo, éste es el principal componente de los productos de panadería como las galletitas.

El grano de trigo está compuesto por tegumentos, que constituyen el salvado, rico en fibras celulósicas y hemicelulósicas, y sales minerales como hierro y calcio, aunque la disponibilidad biológica de estos componentes está limitada por estar complejados con ácido fítico. El germen, rico en nutrientes, contiene proteínas, lípidos, vitamina B1 y vitamina E. Finalmente el endosperma, que constituye la mayor parte del grano, consiste principalmente en almidón y contiene el 70 % de las proteínas del grano. Entre los antioxidantes que se encuentran en el trigo se destacan algunos ácidos fenólicos, el selenio, los tocoferoles y tocotrienoles y los flavonoides. Sin embargo, al igual que ocurre con la mayoría de las vitaminas y minerales, las sustancias antioxidantes del trigo se concentran principalmente en los tegumentos y se pierden al refinar la harina (Pallarés y col., 2007).

La importancia de la harina en los productos de panadería se debe principalmente a que las proteínas de almacenamiento del trigo forman durante el amasado una red conocida como gluten. El gluten otorga extensibilidad (permite un cambio de forma), impermeabilidad al gas (permite la hinchazón de la masa durante la fermentación), elasticidad y capacidad de retención de agua a la masa. Una de las características deseables en las galletitas es que sean de poco espesor, por lo que, dependiendo de la formulación, la masa debe pincharse para evitar grandes burbujas de gas.

3.1.1.2 Almidón de maíz

El almidón es un hidrato de carbono compuesto por amilosa y amilopectina organizado en gránulos. La amilosa es un polímero principalmente lineal de D-glucosa unidas por uniones α -D-(1-4), y forma estructuras helicoidales capaces de incluir otras moléculas como lípidos. La amilopectina, si bien es también un polímero de D-glucosa unida por uniones α -D-(1-4), se encuentra ramificada con enlaces α -(1-6). Los gránulos de almidón son birrefringentes y tienen una estructura semicristalina.

Una de las características del almidón es su capacidad de gelatinizar. Al calentar el almidón con exceso de agua se produce un hinchamiento de los gránulos por la absorción de agua. La viscosidad de la suspensión aumenta, se pierde la birrefringencia y la cristalinidad, la amilosa sale del gránulo y los gránulos se rompen. Este proceso se conoce como gelatinización y vuelve más digerible al almidón (Whistler y Daniel, 1993).

En productos como las galletitas el almidón no aporta sabor sino que modifica la textura del producto. El agregado de este polímero tiene un efecto de “dilución” sobre las proteínas de trigo, aumentando el contenido de almidón ya presente, y generando un gluten más extensible. El resultado es una masa más suave, un producto final con una textura más delicada y más fácil de partir (Petrofsk y Hosene, 1995; Manley, 2000).

3.1.1.3 Azúcar

La sacarosa que se utiliza normalmente para la producción de galletitas está compuesta por fructosa y glucosa unidas por un enlace α -(1-2). Este hidrato de carbono no presenta poder reductor, ya que los dos hidroxilos hemiacetálicos están formando parte del enlace. Su uso principal en las galletitas es como saborizante, pero tiene algunos efectos sobre las propiedades reológicas de la masa. El agregado de azúcar disminuye la viscosidad de la masa y el tiempo de relajación y aumenta la superficie de la masa al reducir su espesor. Las galletitas ricas en azúcar han demostrado poseer una textura extremadamente cohesiva y un producto final más crujiente (Maache-Rezzoug y col., 1998). Estas características se deberían a que el azúcar se disuelve en la masa dependiendo de la cantidad de agua disponible. Luego se recrystaliza o forma una fase amorfa vítrea post horneado modificando las características del producto (Manley, 2000). Esta recrystalización de la sacarosa es también la responsable de pequeñas rupturas e imperfecciones que pueden presentarse en el producto final (Parey y col., 2009).

3.1.1.4 Leche en polvo descremada (LPD)

La incorporación de leche a productos de panadería tiene varios efectos beneficiosos. En primer lugar la reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático) se ve favorecida en las galletitas con LPD, ya que la leche aporta sustratos para esta reacción: grupos ϵ -amino de residuos de lisina y lactosa, un disacárido con poder reductor (Van Boekel, 1998). El resultado de esto es una coloración dorada en la superficie de las galletitas (Manley, 2000). Además, la LPD aumenta el contenido de calcio, fósforo y riboflavina (Cheftel y Cheftel, 1983), y el contenido de proteínas ricas en aminoácidos esenciales como lisina, metionina, isoleucina y triptofano (Conforti, 2009).

3.1.1.5 Agentes leudantes

Los agentes leudantes químicos son generalmente sales inorgánicas que generan gas durante el horneado y permiten la generación de un producto más expandido con una textura más suave (Manley, 2000). El bicarbonato de sodio es una de las sales más utilizadas; cuando está en contacto con cualquier agente ácido o durante la cocción, genera burbujas de dióxido de carbono permitiendo el leudado de la masa. El polvo para hornear tradicionalmente utilizado es una combinación de bicarbonato de sodio con algún ácido orgánico como puede ser el ácido tartárico o reguladores de acidez como el fosfato monocálcico; la función de esta combinación es retardar la generación de burbujas hasta que la masa ingrese al horno (Manley, 2000).

3.1.1.6 Aceites y grasas

Los aceites y las grasas de los alimentos están compuestos por triglicéridos y son altamente calóricos. Sin embargo, son un componente fundamental en la producción de galletitas, debido tanto al sabor como a la textura que aportan. La adición de lípidos a la masa disminuye la viscosidad de la misma y su tiempo de relajación. Contribuye además a la obtención de un producto de menor espesor, más suave y homogéneo. Estos efectos se deben a que los lípidos rodean las proteínas y los gránulos de almidón, aislándolos, disminuyendo la densidad de la red y evitando la formación de una red cohesiva y continua. Sin embargo, un exceso de lípidos produce una estructura demasiado frágil con una gran tendencia a colapsar (Maache-Rezzoug y col., 1998).

Generalmente, por sus características funcionales, las grasas animales o los aceites hidrogenados son preferidos en la industria de las galletitas (Rogers, 2004), ya que las masas hechas con grasa semi-sólida poseen una mejor estructura que las preparadas con aceite (Manley, 2000). Sin embargo, estos lípidos no son recomendados para la preparación de productos saludables, ya que los aceites hidrogenados pueden contener isómeros *trans*, y las grasas son ricas en ácidos grasos saturados. Esto provoca un perfil lipídico desfavorable para el

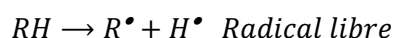
consumidor, que se traduce en un aumento en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Delplanque y col., 2001; Caponio y col., 2013). Los resultados obtenidos por Tavella y col. (2000) sobre el perfil de ácidos grasos en distintos alimentos consumidos habitualmente en Argentina, mostró que las galletitas contenían entre 2,85 y 28,95 g de ácidos grasos *trans* por cada 100 g de lípidos totales, a la vez que mostraron altos contenidos de ácidos grasos saturados, especialmente de ácido palmítico (16:0).

Los aceites vegetales no contienen ácidos grasos *trans* y, por ser un alimento vegetal, no poseen colesterol. El perfil de ácidos grasos de los aceites varía ampliamente dependiendo de la materia prima utilizada. En general se recomienda utilizar lípidos con ácidos grasos insaturados (*cis*), ya que su consumo produce una favorable disminución del colesterol LDL (Mensink y col., 2003). En este sentido, el ácido linoleico (18:2 ω6) y el ácido oleico (18:1 ω9) son los más efectivos para disminuir los niveles de colesterol plasmático, siendo además más estables que los aceites más insaturados (Delplanque y col., 2001).

Los lípidos son el componente más susceptible a la oxidación, resultando en un producto rancio e inaceptable por el consumidor. La oxidación lipídica es un proceso autocatalítico mediado por radicales libres que se favorece por la luz y consta de tres etapas (Lupano, 2013).

- Etapa de iniciación de la oxidación lipídica

La *iniciación primaria* ocurre cuando los lípidos insaturados (representados RH) pierden un radical H• para formar radicales alquilo R•.



Los ácidos grasos insaturados poseen un enlace σ y un enlace π (a diferencia de los saturados que sólo tienen enlaces σ). El enlace π es más débil y está más expuesto, es por esto que los electrones situados en este enlace son más reactivos. El carácter nucleofílico de los dobles enlaces los hace extremadamente susceptibles a compuestos como el oxígeno singulete, un agente fuertemente electrofílico que se puede generar por fotosensibilización o por reacción con el peróxido de hidrógeno (Lupano, 2013). Esta etapa puede ocurrir mediante dos rutas:

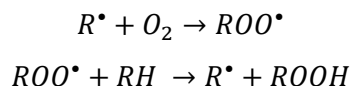
Ruta tipo 1: Los pigmentos de los alimentos, como la clorofila, pueden absorber la luz para pasar a un estado electrónicamente excitado, y luego al retornar a su estado basal pueden reaccionar con los RH, generando radicales R•, actuando como iniciadores de reacción.

Ruta tipo 2: El radical R• se forma por la presencia del oxígeno singulete. Esta ruta es favorecida por altas concentraciones de oxígeno.

Cuando la reacción está más avanzada y hay un alto contenido de ROOH, ocurre la llamada *iniciación secundaria*, motivada por la descomposición de los hidroperóxidos.

- Etapa de propagación

Durante esta etapa se forman compuestos radicalarios a partir de otros radicales ya formados:



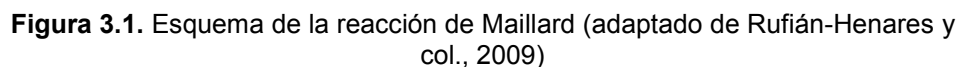
El primer paso consiste en la adición de un oxígeno al radical alquílico resultando en un ROO[•], que se conoce como radical peroxilo. Estos radicales son inestables y sustraen un hidrogeno de otra molécula, como un ácido graso insaturado cuyo enlace carbono-hidrógeno es débil. El resultado final es la formación de un hidroperóxido de ácido graso ROOH y un nuevo radical alquilo, propagando la reacción (Lupano, 2013).

- Etapa de finalización

En la etapa final de la oxidación lipídica, dos radicales se combinan para formar especies no radicalarias. En un ambiente con presencia de oxígeno, los radicales libres predominantes son el peroxilo (ROO[•]) y el alcóxilo (RO[•]). De este modo, las reacciones de terminación se pueden dar entre radicales peroxilo y alcóxilo. El resultado final son aldehídos, ésteres, cetonas, etc. Algunas de estas moléculas son volátiles y dan el aroma desagradable de los lípidos oxidados.

La velocidad de la oxidación lipídica depende del tipo de ácidos grasos involucrados. Existe una estrecha relación entre la composición de ácidos grasos de los aceites y el tiempo de inducción. Los ácidos grasos saturados a temperatura ambiente prácticamente no sufren oxidación, mientras que en los ácidos grasos insaturados la oxidación es mayor y aumenta con el número de dobles enlaces. La oxidación también depende de la posición y la geometría de las insaturaciones: los dobles enlaces conjugados son más reactivos que los no conjugados, y los isómeros *cis* se oxidan más fácilmente que los *trans* (Lupano, 2013). Entre los factores ambientales que pueden influir sobre la oxidación lipídica se incluye la concentración de oxígeno, la temperatura y la actividad acuosa (*a_w*). Si el oxígeno abunda, la velocidad de oxidación se hace independiente de la concentración del mismo, pero a concentraciones de oxígeno muy bajas, la velocidad es aproximadamente proporcional a su concentración. En general, un aumento de la temperatura aumenta la velocidad de oxidación lipídica. En cambio,

Durante el calentamiento, los alimentos ricos en proteínas e hidratos de carbono pueden sufrir modificaciones como el pardeamiento no enzimático (caramelización y reacción de Maillard). La reacción de Maillard involucra la interacción entre grupos amino generalmente de las proteínas con grupos carbonilo, fundamentalmente de hidratos de carbono con capacidad reductora (Van Boekel, 1998). Este es un conjunto complejo de reacciones químicas, que se pueden ver resumidas en la Figura. 3.1. La caramelización, en cambio, requiere condiciones más extremas y sólo involucra la degradación de azúcares (Ramírez-Jiménez y col., 2001).



La reacción de Maillard tiene lugar entre compuestos con una función amina primaria (α -NH₂ terminal, α -NH₂ de aminoácidos libres, ϵ -NH₂ de los residuos de lisina, etc.) y compuestos con grupos carbonilo (azúcares reductores como aldosas, ácido ascórbico, vitamina K, compuestos aromáticos como el aldehído cinámico o la vainillina, aldehídos y cetonas producto de la oxidación de lípidos, etc.) (Lupano, 2013). La velocidad de esta reacción se favorece por las altas temperaturas alcanzadas durante el horneado, actividades acuosas intermedias (entre 0,55 y 0,75) y pH alcalino.

La reacción de Maillard se puede dividir en 3 etapas:

- 1^{ra} Etapa de la reacción de Maillard

Formación de la base de Schiff por condensación del grupo carbonilo y el grupo amino y posterior deshidratación (Figura 3.2)

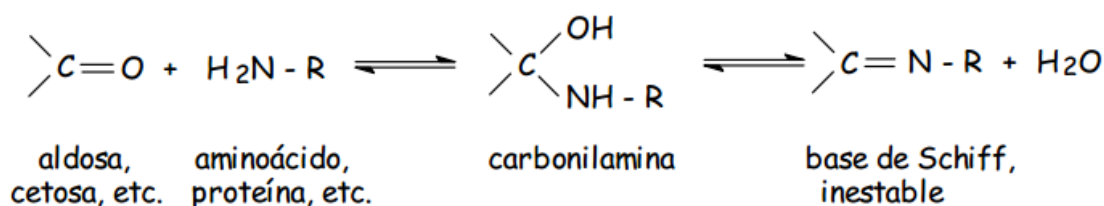


Figura 3.2. Formación de una base de Schiff (tomada de Lupano, 2013)

La base de Schiff formada es inestable y se isomeriza por un reordenamiento dando lugar a una aldosaamina (reordenamiento de Heyns) o cetosaamina (reordenamiento de Amadori), según la naturaleza del glúcido. Durante esta etapa no aparece color ni hay absorción en el UV. La reacción es reversible sólo hasta la formación de la base de Schiff (paso A de la Figura 3.1), es decir que si continúa (paso B de la Figura 3.1) sí hay una disminución en el valor nutricional del producto por pérdida de lisina (un aminoácido esencial).

- 2^{da} Etapa

Los compuestos formados en la 1^{ra} etapa se deshidratan dando lugar a distintos compuestos secundarios dependiendo del pH y la temperatura del medio. A pH bajos, se forma hidroximetilfurfural (HMF) a partir de hexosas (paso C de la Figura 3.1). Por otro lado, los compuestos de Amadori pueden escindirse dando lugar a compuestos dicarbonilo como el diacetilo (paso D). Algunos de estos derivados α - β -dicarbonilados pueden reaccionar con los grupos amino todavía presentes para dar lugar a nuevos aldehídos con un carbono menos que el aminoácido que le dio origen (degradación de Strecker) (paso E). Estos nuevos compuestos

carbonilo pueden reaccionar entre sí, y dar origen a compuestos con aroma. En esta etapa intermedia no aparece color pardo, aunque puede aparecer color amarillo, y hay un aumento de la absorción en el UV cercano.

- 3^{ra} Etapa

Durante la etapa final de la reacción de Maillard (pasos F y G), ocurren dos tipos de reacciones: la condensación aldólica y la polimerización aldehído-imina, con formación de compuestos nitrogenados heterocíclicos. Estos compuestos coloreados de alto peso molecular conocidos como melanoidinas presentan estructuras muy complejas y se los relaciona con distintos efectos sobre la salud. La concentración de estos compuestos puede ser medida inespecíficamente a partir de la absorbancia a 420 nm (Lupano, 2013). Por otro lado también pueden formarse nuevos compuestos volátiles de bajo peso molecular.

3.1.2.1 Efectos fisiológicos de los productos de Maillard

Actualmente el pardeamiento no enzimático es un tema de gran interés, no sólo en la industria alimentaria, sino también en medicina, ya que puede tener consecuencias a nivel nutricional y biológico, tanto favorables como negativas (Delgado-Andrade y col., 2010^a).

Existen compuestos que han sido señalados por sus características mutagénicas y carcinogénicas (Morales y col., 2009). Por ejemplo, el hidroximetilfurfural (HMF), que se puede producir a partir de la descomposición de hexosas durante el pardeamiento no enzimático (Maillard o caramelización), ha sido señalado como citotóxico, genotóxico y como potencial cancerígeno (Gökmen y Senyuva, 2006, Delgado-Andrade y col., 2009). Es por esto que su presencia es indeseada en alimentos procesados. Por otro lado, la acrilamida es otro de los compuestos que se pueden generar en las condiciones del pardeamiento no enzimático. Una de las vías de formación de este compuesto neurotóxico y potencialmente cancerígeno es a través de la reacción de la asparagina con los grupos carbonilo libres, como los de un azúcar reductor (Graf y col., 2006). Sin embargo, los efectos citotóxicos de los compuestos de Maillard han sido leves en sistemas modelo a altas concentraciones y a tiempos de calentamiento muy prolongados. Se considera que en los alimentos su concentración no es riesgosa, y particularmente los productos de Maillard presentes en pan y galletitas han demostrado no ser tóxicas (Wang y col., 2011). Es por esto que la atención se ha centrado principalmente en los efectos benéficos de estos compuestos.

Uno de los principales aspectos favorables de los compuestos de Maillard es el poder antioxidante que presentan los productos generados en las últimas etapas. La incorporación de estos compuestos en la dieta podría proteger al cuerpo del estrés oxidativo (Martín y col., 2009).

Además, los compuestos de Maillard poseen un amplio espectro de beneficios sobre la salud. Distintos estudios demostraron que podían presentar efectos antihipertensivos, prebióticos y antimicrobianos. Estos ensayos se realizaron en sistemas modelo y en algunos alimentos (Borrelli y Fogliano 2005; Rufián-Henares y Morales, 2007^a; Kitryté y col., 2012). Por otro lado, Lindenmeier y col (2002) describieron el efecto modulador que presentaban las melanoidinas de la corteza del pan sobre células intestinales Caco-2. Existen algunos trabajos realizados por el grupo de Delgado-Andrade, en donde se evaluó el efecto de melanoidinas obtenidas en sistemas modelo y algunos alimentos como el pan, sobre ratas Wistar (Delgado-Andrade y col., 2004; Delgado-Andrade y col., 2005^a; Delgado-Andrade y col., 2013^{a,b}; Roncero-Ramos y col., 2013^{a,b,c,d}). Estos ensayos estaban principalmente orientados a la evaluación de la biodisponibilidad de minerales o a la absorción/excreción de los compuestos de Maillard. Sin embargo, no se encontró en bibliografía un estudio integral en donde se evalúen globalmente los efectos de las melanoidinas en un alimento como las galletitas.

- Capacidad antioxidante de productos de Maillard

Los productos de la reacción de Maillard poseen un importante poder antioxidante. Aunque se desconoce la naturaleza real de los productos del pardeamiento no enzimático, las melanoidinas formadas en las últimas etapas parecen ser los compuestos con mayor capacidad antioxidante. En relación a esta característica, se ha demostrado que los compuestos de Maillard presentan la capacidad de quelar metales de transición y atrapar radicales libres (Martín y col., 2009; Wang y col., 2011).

El efecto antioxidante ha sido demostrado a nivel celular; los resultados de Martín y col. (2009) indican que las melanoidinas presentes en galletitas podían proteger a células hepáticas (Hep G2) del daño producido por los radicales libres. Sin embargo, el nivel al cual esto puede ocurrir *in vivo* es discutible, ya que las melanoidinas no son completamente absorbidas en el tracto digestivo. Es por esto que desde un punto de vista funcional se considera que las melanoidinas podrían ser consideradas “fibra dietaria antioxidante” con capacidad de inhibir los radicales libres formados en el tracto digestivo (Saura Calixto, 2010). Por otro lado, Somoza y col. (2005) encontraron que la fracción de melanoidinas que sí puede ser absorbida en el tracto digestivo incrementaba el poder antioxidante total en plasma y aumentaba el contenido de enzimas quimioprotectoras (glutatión transferasa y UDP-glucuroniltransferasa).

- Inhibición del crecimiento de tumores

Existen distintos trabajos en donde se demuestra la capacidad que presentan las melanoidinas de reducir el crecimiento de células cancerosas *in vitro*. Los resultados obtenidos

por Marko y col. (2003) demostraron que ciertos cromóforos derivados de la reacción de Maillard interferían con la proliferación de células cancerígenas gástricas causando la interrupción del ciclo celular e induciendo la apoptosis celular. Otros ensayos mostraron que las melanoidinas extraídas de papas tratadas térmicamente también inhibían el crecimiento de células cancerosas (Langner y Rzeski, 2014). Sin embargo, es claro que se requiere una mayor cantidad de ensayos que permitan verificar el potencial anticancerígeno de los productos de Maillard.

- Actividad antimicrobiana

En los últimos años se ha comenzado a evaluar el impacto que presentan los compuestos de Maillard sobre los microorganismos. Helou y col. (2014) indicaron que la presencia de compuestos derivados de la reacción de Maillard en el medio incrementaba la fase de latencia y disminuía el crecimiento de ciertas cepas de *Escherichia coli*. Los resultados de Monente y col (2015) apoyaron esta teoría y mostraron que las melanoidinas del café podrían inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas. Por otro lado, el grupo de Rufián Henares (Rufián-Henares y Pastoriza de la Cueva, 2009; Rufián-Henares y Delgado-Andrade, 2009^a) evaluó la capacidad antimicrobiana de las melanoidinas sobre bacterias patógenas, tanto en sistemas modelo como en ciertos alimentos (café, cerveza y vino dulce). Estos autores propusieron distintos mecanismos de acción para las melanoidinas: a bajas concentraciones estos compuestos presentarían una actividad bacteriostática debida principalmente a su efecto quelante de hierro; esta capacidad podría además disminuir la virulencia de ciertas bacterias. A altas concentraciones, en cambio, es la capacidad quelante de magnesio de las melanoidinas la que podría desestabilizar a las membranas bacterianas (Wang y col., 2011).

- Actividad prebiótica de productos de Maillard

El término “prebiótico” se utiliza para definir un ingrediente alimenticio no digerible que produce efectos beneficiosos en la salud del consumidor al estimular el crecimiento de bacterias que se consideran benéficas (como las bifidobacterias y los lactobacilos) por sobre aquéllas que se consideran nocivas (Ashwell, 2002). Sin embargo, en general este término se reserva para hidratos de carbono no digeribles como fructooligosacáridos e inulina (Morales y col., 2012).

Como parte de los productos de Maillard no pueden ser digeridos en la parte superior del tracto digestivo, existiría la posibilidad de que las melanoidinas actúen como parte de la fracción no digerible de los alimentos y lleguen al intestino grueso casi sin modificarse. Luego, los compuestos de Maillard podrían ser metabolizados por las bacterias presentes en el colon, lo que los convertiría en un potencial prebiótico (Morales y col., 2012). Apoyando esta teoría,

Borrelli y Fogliano (2005) encontraron que la presencia de melanoidinas de la corteza del pan era capaz de incrementar selectivamente el crecimiento de bacterias anaerobias como las bifidobacterias. Estos investigadores concluyeron entonces que los compuestos de Maillard podrían tener un efecto prebiótico similar al de la fibra dietaria.

- Actividad antihipertensiva de productos de Maillard

La actividad antihipertensiva de los compuestos de Maillard ha sido evaluada sobre sistemas modelo y alimentos (como café), a partir del estudio de la enzima convertidora de angiotensina (o ACE por sus siglas en inglés) (Wang y col., 2011). Los ensayos *in vitro* mostraron que la actividad antihipertensiva de las melanoidinas estaría relacionada con la capacidad de inhibir la acción de la ACE, probablemente debido a su capacidad de quelar cationes como el zinc (ya que la ACE es una enzima zinc dependiente) (Rufián-Henares y Morales, 2007^a; Hwang y col., 2011).

3.2 OBJETIVOS

Objetivo general del capítulo

Desarrollar una tapa de galletita de prolongada vida útil y un alto contenido de antioxidantes generados durante el horneado (vía reacción de Maillard) utilizando una formulación con un reducido contenido de azúcar refinada y lípidos de origen vegetal.

Objetivos específicos

- Reemplazar la fase grasa utilizada habitualmente en galletitas por aceites vegetales, más recomendados desde el punto de vista nutricional.
- Evaluar la vida útil de las galletitas relacionándola con el aceite utilizado en su elaboración.
- Estudiar el efecto de las condiciones de cocción (tiempo y temperatura de horneado) en la generación de compuestos con actividad antioxidante derivados de la reacción de Maillard.
- Analizar la liberación de antioxidantes presentes en las galletitas durante los procesos de digestión y fermentación simulada.
- Comprobar los efectos fisiológicos de los compuestos de Maillard, como aumento de la capacidad antioxidante en plasma, disminución del estrés oxidativo, efectos prebióticos y antihipertensivos, en un ensayo *in vivo* con animales de laboratorio.
- Evaluar el posible efecto de los compuestos de Maillard sobre la vida útil de las galletitas, retardando la oxidación lipídica

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Ingredientes utilizados para la preparación de galletitas

Harina de trigo (Favorita 000, Molinos Río de la Plata, Buenos Aires, Argentina), almidón de maíz (Maizena, Unilever de Argentina S.A., Buenos Aires), leche en polvo descremada (SanCor, Sunchales, Santa Fe, Argentina), aceite de maíz (Cocinero, Molinos Río de La Plata, Buenos Aires, Argentina), aceite de girasol (Cocinero, Molinos Río de La Plata, Buenos Aires, Argentina), aceite de girasol alto oleico (Propia, Lezama, Buenos Aires, Argentina), sacarosa (Ledesma, Jujuy, Argentina) y polvo para hornear (Royal, Kraft Foods, Argentina).

3.3.2 Selección del aceite: tiempo de conservación

3.3.2.1 Estabilidad oxidativa de los aceites

La velocidad de oxidación lipídica depende de la estructura química de los aceites, de los procesos a los que fue sometido y de las condiciones de almacenamiento. La oxidación es un proceso lento hasta que la cantidad de radicales libres supera cierto nivel y la reacción comienza a acelerarse (Cheftel y Cheftel, 1976). El tiempo transcurrido hasta que la oxidación se acelera se denomina “tiempo de inducción” (Ti) (AOCS, 1998). Bajo condiciones estandarizadas, esta medida se utiliza como indicador de la resistencia a la oxidación del producto (Arain y col., 2009).

Para determinar el Ti de los distintos aceites se utilizó un equipo Rancimat 743 (Metrohm AG, Herisau, Suiza). El esquema del equipo se puede ver en la Figura 3.3.

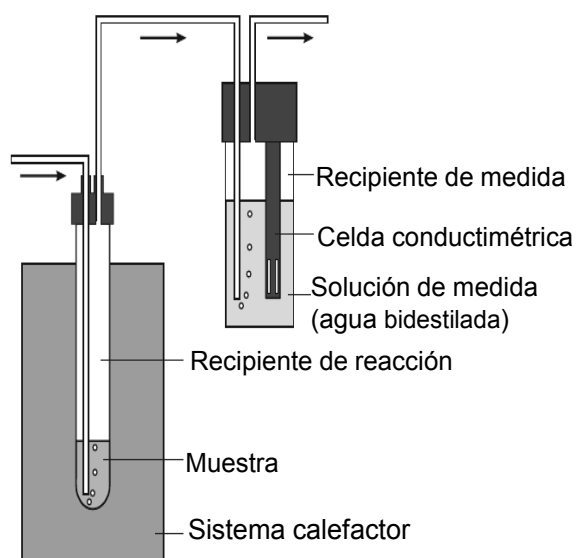


Figura 3.3. Esquema del equipo Rancimat utilizado (adaptado de Metrohm, 2001)

Las muestras (5 g de cada uno de los aceites) fueron colocadas en el equipo, termostatizadas a 110 °C y sometidas al burbujeo continuo de una corriente de aire (20 L/h).

Durante el calentamiento la muestra se oxida y los productos de la reacción son transportados hacia un recipiente con agua bidestilada. La llegada de los productos de oxidación, entre ellos ácidos orgánicos, aumenta la conductividad de la solución, la cual es continuamente registrada. Del gráfico de conductividad en función del tiempo se obtiene el punto de inflexión que representa el tiempo de inducción (Ti).

Las medidas fueron realizadas por duplicado. El resultado final se expresó como Ti (horas).

3.3.2.2. *Elaboración y conservación de las galletitas*

El proceso de fabricación de galletitas es relativamente sencillo y general para casi todos los productos. En primer lugar las materias primas seleccionadas deben ser acondicionadas y mezcladas. Durante el mezclado se incorporan los ingredientes líquidos que permiten a la harina hidratarse y al azúcar disolverse. Por el tratamiento mecánico aplicado durante el amasado las proteínas de la harina forman la red conocida como gluten. Una vez que se obtiene una masa homogénea, se procede al laminado, que puede ser mecánico o manual. El objetivo de este paso es obtener una masa con el espesor deseado. Como la masa presenta propiedades elásticas, antes del corte se recomienda dejarla reposar unos minutos; de esta manera se tiene un mejor control sobre la forma del producto final. Luego la masa se corta con la forma deseada y se la lleva al horno (Manley, 2000).

Para preparar las galletitas se utilizó la siguiente formulación: 70 g de harina de trigo; 60 g de almidón de maíz; 20 g de leche en polvo descremada; 25 g de azúcar; 1,8 g de polvo para hornear; 20 g de aceite y 36,5 g de agua potable. Se prepararon 3 formulaciones distintas, utilizando aceite de girasol, aceite de maíz o aceite de girasol alto oleico.

Los ingredientes secos se colocaron en el recipiente de una batidora Philips Cucina (Sao Pablo, Brasil). El aceite se agregó en tres fracciones, mezclando 1 min a velocidad 1 (711 rpm) después de cada agregado. Luego se incorporó el agua en dos fracciones mezclando en total 2 min a velocidad 2 (754 rpm) y finalmente se mezcló por 1 min más a velocidad 1. Luego la masa se colocó en una bolsa de polipropileno para evitar la desecación y se la dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min (Conforti y Lupano, 2004).

Las tres masas obtenidas se estiraron con un rodillo de cocina hasta obtener un espesor de 0,3 cm y se las dejó reposar por 15 min más. La superficie se pinchó para evitar la formación de burbujas grandes de gas durante el horneado. Finalmente se cortó la masa en rectángulos (3,3 x 5,2 cm) que fueron colocados sobre planchas de silicona. Las masas se hornearon en

horno eléctrico (F9M, Ariston, Fabriano, Italia) a 190 °C por 9,5 min controlando la temperatura por medio de termocuplas.

Finalizado el tiempo de cocción las galletitas fueron retiradas del horno y se las dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Las galletitas recién horneadas fueron envasadas al vacío (Vacuumed Saver, Food Saver, Tila) en paquetes de 5 galletitas cada uno y conservadas a 20 °C hasta el momento del análisis. Se realizaron 2 horneadas individuales de cada una de las formulaciones que fueron utilizadas para los distintos ensayos .

Para evaluar el efecto de la absorción de agua y el nivel de oxidación lipídica durante el tiempo de conservación de las galletitas (los principales limitantes del tiempo de vida útil), el envase elegido fue polipropileno, el cual es una película traslúcida y brillante, muy resistente a la punción y tensión. Este material es relativamente permeable al vapor de y muy permeable al oxígeno (Aparicio y col., 2008). El polipropileno es muy utilizado en alimentos y trabajos anteriores lo han recomendado para galletitas de manteca (de Dienes y Navarro, 2008). Se tomaron muestras a distintos tiempos durante 6 meses (187 días), sobre las que se determinó la actividad acuosa, el contenido de humedad, el color, la textura y el grado de oxidación lipídica.

3.3.2.3 Actividad acuosa

La actividad acuosa (a_w) de un alimento es un parámetro que indica la disponibilidad de agua. Se define como la presión de vapor de agua del alimento sobre la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (Fennema, 1993). Este parámetro es útil para estimar la susceptibilidad de los alimentos a distintas reacciones y al crecimiento de microorganismos.

El equipo utilizado para esta determinación fue un AquaLab Serie3 (Decagon Devices, Inc., Pullman). La muestra partida en trozos se colocó en un compartimiento que luego se cerró. Cuando la a_w de la muestra y la humedad relativa del aire se encuentran en equilibrio, se cumple que:

$$a_w = \frac{HRE}{100} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Siendo HRE la humedad relativa del aire en equilibrio con la muestra (Fennema, 1993). En el equipo, un sensor de punto de rocío mide la temperatura de rocío del aire en el compartimiento donde se coloca la muestra mientras que un termómetro infrarrojo mide la temperatura. Con estos valores el equipo calcula la humedad relativa del aire en equilibrio con la muestra (Decagon, 2011).

La determinación se realizó a 25 °C al menos por duplicado sobre las muestras de galletitas preparadas con los distintos aceites tomadas a distintos tiempos de conservación.

3.3.2.4 Contenido de humedad

Se colocaron las muestras de galletitas previamente trituradas con mortero en recipientes de papel metalizado de peso m_0 . Se tomó el peso de la muestra original más el papel metalizado (m_1) y se llevó a estufa a 103 ± 3 °C toda la noche. Finalizado este período se volvieron a pesar las muestras (m_2).

El porcentaje de agua en las muestras se calculó al menos por duplicado como:

$$\text{Humedad (\%)} = 100 \frac{(m_1 - m_0) - (m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \quad \text{Ec. 3.2}$$

3.3.2.5 Color superficial

El color es un atributo sumamente importante, ya que el consumidor responde primero a las características visuales del alimento (Fayle y Gerrard, 2002). Durante el tiempo de conservación, el color puede verse modificado por la reacción de Maillard (en productos como la leche en polvo o la miel), la oxidación lipídica, reacciones enzimáticas, etc.

Para la medida de los parámetros visuales se utilizó un colorímetro triestímulo Chroma meter CR 300 Minolta (Osaka, Japón), con el que se obtuvieron los parámetros de Hunter sobre al menos 4 muestras de galletitas. Se obtuvo el valor L^* o luminosidad (0: negro, 100: blanco); el valor a^* (positivo da el grado de rojo, negativo da el valor de su opuesto, el verde) y el valor b^* (b^+ amarillo, b^- azul) tal como se ve en la Figura 3.4.

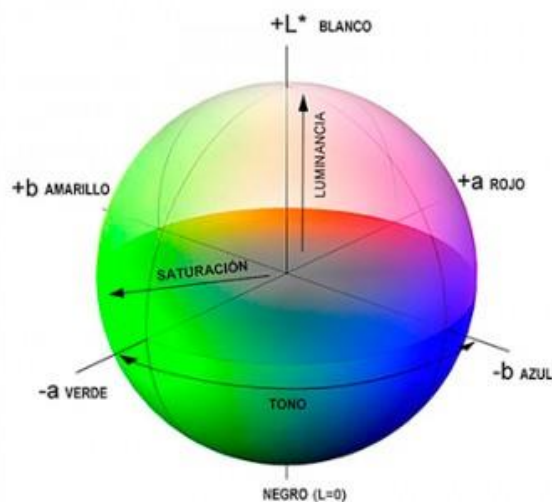


Figura 3.4. Representación de los valores de L^* , a^* , b^* y croma (o saturación) (Gómez, 2016)

A partir de estos parámetros se obtuvo el valor croma (o saturación): mayores valores de croma son percibidos por el ojo como un color más intenso. Este parámetro se calculó acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Croma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ec. 3.3}$$

3.3.2.6 Análisis de textura

La percepción de la textura de los alimentos es una de las características fundamentales a la hora de evaluar la aceptabilidad de un producto como las galletitas. La textura incluye propiedades como la dureza, la adhesividad, la gomosidad y todas aquellas sensaciones relacionadas con la masticación.

Durante el tiempo de conservación las galletitas se sometieron a un ensayo de 3 puntos, con texturómetro (TA,XT2s Texture Analyser Stable Micro Systems Ltd, Reino Unido) (Figura 3.5). Estas determinaciones se realizaron al menos por cuadruplicado.



Figura 3.5. Fotos de un ensayo de textura de 3 puntos (obtenida de <http://www.swantech.fr.../>)

En el ensayo, la distancia entre los soportes (L) fue de 1,7 cm, la velocidad de la sonda fue de 0,5 mm/s mientras que la velocidad en el pre-ensayo y en el post-ensayo fue de 0,5 mm/s y de 10 mm/s, respectivamente. Las galletitas fueron colocadas con la cara inferior hacia arriba. A partir de los datos obtenidos se realizó un gráfico de fuerza vs tiempo (Figura 3.6).

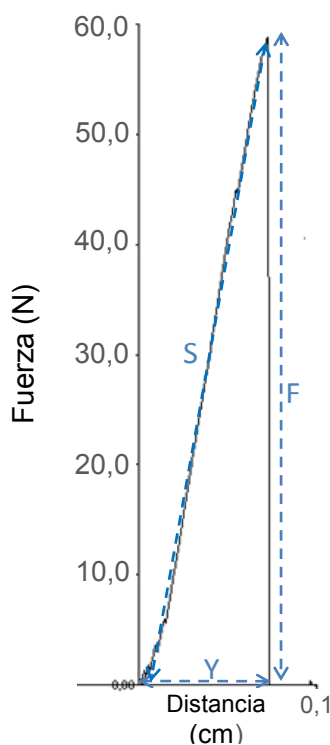


Figura 3.6. Gráfico obtenido en un ensayo de 3 puntos realizado sobre una galletita

A partir de este gráfico se pudo obtener el valor de la fuerza máxima F (N) requerida para romper la galletita y la deformación Y (cm) o distancia recorrida por la sonda desde que toca la galletita hasta que la rompe (Baltsavias y col., 1997). Con estos valores más el valor del ancho (d) y el espesor (b) de cada galletita se calculó el estrés o esfuerzo de fractura σ (N/cm²) (ecuación 3.4) y la tensión de deformación ε (ecuación 3.5). También se determinó la pendiente del gráfico fuerza vs deformación (S), y se calculó el módulo de elasticidad en flexión o módulo de Young E (N/cm²) (ecuación 3.6). La pendiente da una idea de cuán quebradiza es la galletita, cuando mayor es su valor más quebradizo es el producto.

$$\sigma = \frac{3FL}{2db^2} \quad \text{Ec. 3.4}$$

$$\varepsilon = \frac{6bY}{L^2} \quad \text{Ec. 3.5}$$

$$E = \frac{L^3 S}{4db^3} \quad \text{Ec. 3.6}$$

3.3.2.7 Determinación de compuestos primarios de oxidación lipídica

Para la determinación de peróxidos en un producto como las galletitas es necesario realizar previamente una extracción de los lípidos. La American Association of Cereal Chemists (AACC) recomienda liberar los lípidos de la matriz de panificados por medio de un pretratamiento ácido en caliente (AACC 30-10, 1983). En el presente trabajo se eliminó el calentamiento para evitar la oxidación de la muestra por el uso de alta temperatura.

En un vaso de precipitado se colocaron 7,6 g de muestra, se agregaron 10 ml de HCl (6,95 N) y se agitó por 30 min. Luego el contenido se transfirió a una probeta graduada de 100 ml y el vaso de precipitado se lavó con dos fracciones de 10 ml de alcohol etílico. Se agregaron 50 ml de éter de petróleo (30-65 Ppb) y ambas fases entraron en contacto por inversión.

La probeta se dejó reposar por 24 horas hasta la separación de las fases. Al cabo de este tiempo se leyó el volumen de éter, se tomó una alícuota de esta fase con pipeta de doble aforo y se evaporó el contenido de éter en un vaso de precipitado (previamente tarado) a temperatura ambiente. El contenido de lípidos se calculó por diferencia de peso del vaso una vez evaporado el éter.

En ensayos preliminares se verificó que este proceso de extracción no modificaba el contenido de peróxidos de la muestra ($P > 0,05$).

Se determinó el índice de peróxidos en el aceite extraído de las galletitas utilizando el método del hierro-tiocianato descrito por la *International Dairy Federation* (IDF), junto con ISO (2006), con modificaciones. La cuantificación de peróxidos por este método se basa en la capacidad de los peróxidos para oxidar el ion ferroso (Fe (II)) a ion férrico (Fe (III)). Posteriormente se forma un complejo de color entre el Fe (III) y el tiocianato. Este método fue elegido debido al bajo contenido en lípidos de las galletitas analizadas (Nielsen y col., 2003); sin embargo, tiene sus limitaciones: el oxígeno disuelto en el solvente puede generar oxidación espontánea de Fe(II) generando altos valores del blanco (Kolthoff y Medalia; 1951). Distintos autores han intentado encontrar un solvente adecuado para la determinación de hidroperóxidos por la técnica de hierro tiocianato: Shantha y Decker (1994) recomendaron una mezcla de cloroformo y metanol. Pero algunas botellas de cloroformo podrían generar medidas del blanco muy altas, ya que este solvente en presencia de radicales libres puede generar el CCl_3^\bullet que posteriormente puede oxidar el ion ferroso, al igual que los radicales libres de los peróxidos, resultando en errores en la técnica (Mihaljević y col., 1996). Por otro lado, por cuestiones ecológicas, la IDF sugirió el uso de un solvente preparado a partir de metanol, 1-decanol y n-hexano, pero éste posee un olor desagradable (IDF-ISO, 2006). Otros trabajos recomendaron el uso de isopropanol en lugar de metanol durante el proceso de extracción (Hara y Radin, 1978). Considerando esto, el solvente seleccionado para las determinaciones fue isopropanol, el cual es seguro si se lo manipula adecuadamente y su uso en laboratorio no genera olores desagradables. Además, por la baja solubilidad del oxígeno en el solvente, (Kretschmer y col., 1946) la desoxigenación del mismo muchas veces es innecesaria. El coeficiente de extinción del complejo rojo formado entre el Fe (III) y el tiocianato, utilizando isopropanol como solvente, fue de 0,062 unidades por microgramo de Fe (III) , más alto que el informado cuando se utiliza la mezcla de metanol/decanol/hexano (0,028 unidades) (IDF-ISO, 2006).

Según la norma IDF-ISO 74 la solución de Fe (II) debe ser preparada *in situ* a partir de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Shantha y Decker, 1994). Pero la preparación de esta solución lleva tiempo, y si durante este proceso parte del Fe (II) se oxida puede llevar a errores en la determinación (Shantha y Decker, 1994). Por esto, para realizar las determinaciones se utilizó una solución recién preparada de $\text{Fe(NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sal de Mohr). Esta sal es conocida por poseer alta solubilidad en agua y por ser estable a la oxidación (Clavijo Díaz, 2002).

Considerando estas modificaciones, se procedió a realizar la determinación. Se añadió alcohol isopropílico (4,95 ml) a 0,1 g de lípido extraído y se homogeneizó durante 15 s utilizando un vortex. A continuación, se añadieron 0,025 ml de una solución de Fe (II) (0,72% p/v de $\text{Fe(NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y 0,025 ml de una solución de tiocianato de amonio (30% p/v). El blanco

de reactivo se preparó de la misma manera, pero sin la muestra. Se midió la absorbancia a 500 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV 1240-mini (Kyoto, Japón).

Para la curva de calibración se utilizó una solución de FeCl_3 (10 mg/ml) como estándar. La misma se preparó a partir de 50 mg de Fe^0 al cual se le agregaron 5 ml de HCl (10 N) y 0,1 ml de H_2O_2 (30 % p/v) para oxidar al hierro. El exceso de peróxido de hidrógeno se eliminó calentando a ebullición 10 min. Una vez que la solución se enfrió se llevó a volumen final de 50 ml en matraz con agua destilada. Finalmente, se tomó 1 ml de la solución obtenida (1000 $\mu\text{g/ml}$) y se llevó a un volumen final de 100 ml con isopropanol.

El valor de peróxidos (PV) se expresó como mmol de oxígeno por kg de aceite, de acuerdo a la siguiente ecuación (IDF-ISO, 2006):

$$PV = \frac{0,5 m_c}{55,8 m} \quad \text{Ec. 3.7}$$

Donde

PV: Índice de peróxidos expresado en mmol O_2/Kg de aceite

m_c : Masa de Fe (III) calculada a partir de la curva de calibración expresada en microgramos

m: Masa de aceite en gramos

55,84 es el peso atómico del Fe, necesario para expresar los resultados en milimoles.

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

3.3.2.8 Determinación de los compuestos secundarios de oxidación lipídica

Los hidroperóxidos formados durante la oxidación lipídica son muy inestables y tienden a descomponerse en compuestos secundarios como aldehídos, cetonas y alcoholes (Hamilton, 1983). El malonaldehído (MDA), uno de los compuestos de degradación, forma un complejo con el ácido tiobarbitúrico (TBA), que puede ser cuantificado espectrofotométricamente (Botsoglou y col., 1994). Para la determinación se utilizó el método desarrollado por Hodges y col. (1999), ya aplicado en galletitas por Mišan y col. (2011).

Se tomaron muestras de galletitas preparadas con distintos aceites distintos tiempos de conservación (días 4, 124, 166 y 187). A las muestras se las trituro con un mortero y se las tamizó por un tamiz de 500 μm . Se colocaron 0,4 g de la muestra homogeneizada y se realizó una extracción con 50,0 ml de etanol/agua (80:20 v/v) con ultrasonido durante 20 min (baño ultrasónico Branson 2510, Danbury, Estados Unidos). A 1 ml del extracto se le agregó 1 ml de la solución -TBA (20 % p/v de ácido tricloroacético y 0,01 % de butilhidroxitolueno) o 1 ml de la solución +TBA (20 % p/v de ácido tricloroacético, 0,01 % de butilhidroxitolueno y 0,65 % de

TBA). Las muestras se calentaron a 70 °C en baño de agua por media hora y luego se centrifugaron a 5000 x g por 10 min (centrífuga 5415 R Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Sobre el sobrenadante se cuantificó la absorbancia de la muestra a 440, 532 y 600 nm (Hitachi U-1900, Tokyo, Japón).

Los equivalentes de MDA se calcularon siguiendo las ecuaciones desarrolladas por Hodges y col. (1999). La medida de la absorbancia a 440 nm permite corregir la interferencia por presencia de azúcares, mientras que determinación de la absorbancia a 600 elimina la interferencia por turbidez inespecífica que podría presentar la muestra:

$$A = [(ABS_{532}^{+TBA} - ABS_{600}^{+TBA}) - (ABS_{532}^{-TBA} - ABS_{600}^{-TBA})] \quad \text{Ec. 3.8}$$

$$B = 0,0571(ABS_{440}^{+TBA} - ABS_{600}^{+TBA}) \quad \text{Ec. 3.9}$$

$$MDA(nmol/mL) = 10^6(A - B/157000) \quad \text{Ec. 10}$$

Con estos valores y considerando la humedad de la muestra se expresó el valor de MDA como nmol/g de muestra seca. Esta determinación se realizó por duplicado.

3.3.3 Condiciones de cocción: Desarrollo de compuestos de Maillard

Los ensayos que se incluyen en esta sección se realizaron en los laboratorios de la cátedra de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, España, bajo la dirección del Prof. Dr. José Ángel Rufián Henares.

3.3.3.1 Elaboración de las galletitas

Se prepararon galletitas con los mismos ingredientes que en la sección 3.3.2.2 eligiendo el aceite de girasol alto oleico como fase lipídica: 35 g de harina de trigo, 25 g de almidón de maíz, 20 g de leche en polvo descremada (LPD), 12,5 g de azúcar, 0,9 g de polvo para hornear, 10 g de aceite de girasol alto oleico y 25 ml de agua potable. La proporción de los ingredientes fue muy similar a la utilizada en la sección 3.3.2.2, a excepción del contenido de LPD, que fue el doble de modo de favorecer la reacción de Maillard. Para compensar esta modificación se redujo el contenido de almidón de maíz y se ajustó el contenido de agua.

Las masas se prepararon tal como se describe en la sección 3.3.2.2 y se llevaron a horno eléctrico (White Westinghouse) para su cocción. Se utilizaron tres condiciones de temperatura de cocción 100, 125 y 150 °C. Durante la cocción a 100 °C se utilizaron tiempos de horneado de 20, 40, 60 y 80 min, mientras que durante la cocción a 125 °C las galletitas se hornearon por 15, 30, 45 y 60 min. Finalmente, durante la cocción a 150 °C se utilizaron los siguientes tiempos de cocción: 15, 20, 25 y 30 min. Para todas las condiciones evaluadas se realizaron horneadas independientes: en total se trabajó con 12 lotes distintos de galletas. Sobre las galletitas recién preparadas se determinó el contenido de humedad y el color superficial.

3.3.3.2 Contenido de humedad

La humedad de las muestras durante los distintos tiempos de cocción se determinó según el método descrito anteriormente (sección 3.3.2.4).

3.3.3.3 Color superficial

La reacción de Maillard es una reacción de pardeamiento no enzimático que genera compuestos de bajo peso molecular que contribuyen al aroma, y compuestos de alto peso molecular responsables del color dorado final del producto. El nivel de color generado durante la cocción puede utilizarse entonces como una medida de la extensión de la reacción de Maillard en los alimentos (Fayle y Gerrard, 2002). Para la medida de los parámetros visuales se utilizó un colorímetro triestímulo Chroma meter CR 300 Minolta (Osaka, Japón) tal como se describe en la

sección 3.3.2.5. Para la comprobar la evolución de la reacción de Maillard se utilizaron distintos parámetros (BI, ΔE y YI) recomendados en la bibliografía. El parámetro Browning Index (BI) es una medida del nivel de pardeamiento de las muestras (Pathare y col., 2013):

$$BI = \frac{100(X - 0,31)}{0,17} \quad \text{Ec. 3.11}$$

Donde:

$$X = \frac{a^* + 1,75 L^*}{5,645 L^* + a^* - 3,01b^*} \quad \text{Ec. 3.12}$$

La extensión del cambio de color se evaluó a partir del parámetro ΔE .

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad \text{Ec. 3.13}$$

Asimismo, se incluyó también el parámetro Yellowing Index (YI) que puede ser utilizado para evaluar la evolución de las reacciones de Maillard (Delgado-Andrade y col, 2010^b).

$$YI = 142,86 \frac{b^*}{L^*} \quad \text{Ec. 3.14}$$

3.3.3.4 Actividad antioxidante de los compuestos de Maillard: Extracción

Para evaluar el contenido de antioxidantes y su liberación se realizó un ensayo de digestibilidad *in vitro* de acuerdo a la técnica estandarizada recomendada por Minekus y col. (2014), seguido por un proceso de fermentación (Del Pino-García y col., 2016). En la Figura 3.7 se puede ver el esquema del proceso.

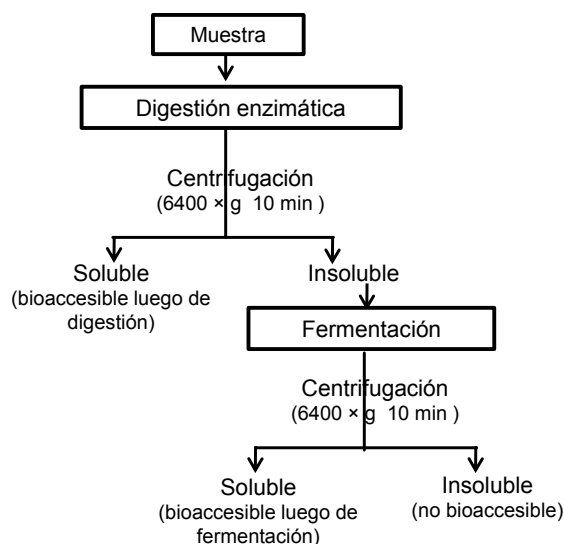


Figura 3.7. Esquema del proceso de digestión y fermentación aplicado sobre las muestras

- Digestión

Para simular las condiciones gastrointestinales se prepararon 3 soluciones de trabajo: solución de fluido salival (SSF, pH=7,00), solución de fluido gástrico (SGF, pH=3) y solución de fluido intestinal (SIF, pH=7,00). La composición de estas soluciones se detalla en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Soluciones utilizadas durante la digestión *in vitro*

	SSF (pH=7,00) (mmol/L)	SGF (pH=3,00) (mmol/L)	SIF (pH=7,00) (mmol/L)
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	1,35	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,12	0,33
NH ₄ (CO ₃) ₂	0,06	0,5	-
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ *	1,5	0,15	0,6
HCl	1,1	15,6	8,4

*El CaCl₂ se incorporó durante la digestión directamente en la mezcla de reacción para evitar precipitación de iones. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

Las galletitas y las masas previamente liofilizas con un quipo Telstar LyoQuest H 40 (Tarrasa, España) fueron procesadas en un molinillo de café para simular el proceso de masticación. De cada formulación se pesó 1,0000 g de muestra y se agregó 1,0 ml de SSF con α -amilasa (150 U/ml) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EEUU) y 5 μ L de la solución de CaCl₂. La mezcla de reacción se incubó durante 2 min a 37 °C en una estufa Thermo Scientific Heraeus (Madrid, España) con agitación constante. Pasado ese tiempo, se agregaron 1,5 ml de la solución gástrica SGF y las muestras fueron llevadas a pH 3,00 con HCl (1 M). Una vez estabilizado el pH, sobre cada una de las muestras se incorporaron 0,5 ml de una solución de pepsina (Sigma-Aldrich) preparada en SGF y 2 μ L de CaCl₂ (0,15 M). La concentración final de la enzima en el tubo de reacción fue de 2000 U/ml. Las muestras se incubaron durante 2 hs a 37 °C con agitación constante.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, para simular la digestión intestinal, se agregaron 3 ml de una solución de bilis (20 mM) (Sigma-Aldrich) preparada en SIF. Las muestras se llevaron a pH 7,00 con NaOH (1 M) y luego se incorporó 1 ml de una solución de pancreatina porcina (Sigma-Aldrich) también preparada en SIF; la actividad final de pancreatina en la mezcla de reacción fue de 100 U/ml. La muestra se dejó digerir durante 2 hs a 37°C con agitación constante. Finalmente, se procedió a detener la digestión colocando las muestras en hielo y centrifugándolas a 6400 \times g por 10 min (centrífuga Universal 320 Hettich, Tuttlingen, Alemania) para separar la fracción soluble (bioaccesible) de la insoluble.

En la Figura 3.8 se puede ver el esquema general del proceso de digestión.

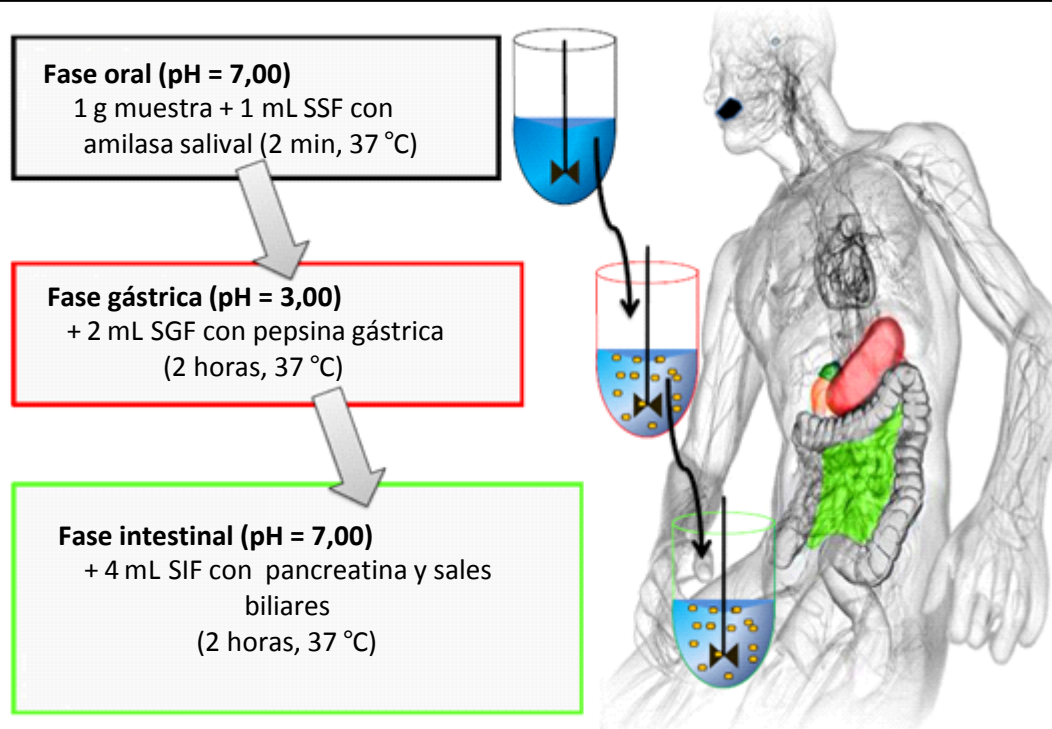


Figura 3.8. Esquema general del proceso de digestión utilizado (Adaptado de <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014...>)

- Fermentación

Sobre la fracción insoluble se realizó una fermentación en condiciones de anaerobiosis en atmósfera reductora (Del Pino-García y col., 2016).

El inóculo se preparó a partir de materia fecal de voluntarios sanos. Para esto, se disolvieron 24 g de materia fecal en 75 ml de buffer fosfato pH 7 (0,1 M). La mezcla se agitó enérgicamente y luego se centrifugó durante 10 min a baja velocidad ($45 \times g$) para evitar la pérdida de bacterias por precipitación (centrífuga Universal 320 Hettich, Tuttlingen, Alemania). El precipitado fue descartado.

El medio anaerobio se preparó tal como lo describen Goering y Van Soest, (1970) con algunas modificaciones. Para el medio de reductor se utilizó cisteína, sulfito de sodio y agua peptona; como un indicador de la óxido-reducción se incorporó una solución de resazurina (Lab Britania 2016; Saura-Calixto y col., 2007). El medio fue desoxigenado mediante una corriente de nitrógeno y luego esterilizado en autoclave para su uso.

Una vez preparados el medio de fermentación y el inóculo, se pesaron 0,2 g de los precipitados obtenidos en el proceso de digestión en sendos tubos falcon. Sobre las muestras se incorporó la solución de fermentación junto con el inóculo. Luego se las llevó a incubación a 37 °C por 20 hs. Finalizado el tiempo de incubación se centrifugaron las muestras nuevamente a $6400 \times g$ por 10 min para separar la fracción soluble (bioaccesible luego de la fermentación) de la insoluble. La fracción insoluble fue liofilizada.

3.3.3.5 Actividad antioxidante de los compuestos de Maillard: Determinación

Se realizaron distintos ensayos de actividad antioxidante sobre las fracciones solubles obtenidas luego del proceso de digestión y fermentación *in vitro* (bioaccesible luego de la digestión y bioaccesible luego de la fermentación). Para expresar los resultados en función de los g de galletita seca se determinó el contenido de muestra antes de la fermentación y digestión, la humedad inicial de la muestra y la humedad del precipitado obtenido luego de la digestión y de la fermentación.

- Actividad antioxidante por DPPH

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) es un radical libre; sus soluciones presentan un color violeta con un máximo de absorbancia a 515 nm (Brand-Williams y col., 1995). En presencia de un compuesto antioxidante el DPPH es reducido y su absorbancia a 515 disminuye, observándose una coloración amarilla (Figura 3.9).

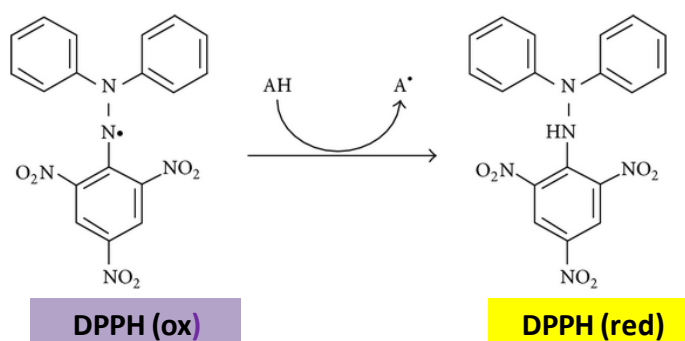


Figura 3.9. Espectro de absorción y reacción involucrada en la determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH (Adaptada de Teixeira y col., 2013)

Se colocaron 20 µl de diluciones apropiadas de las fracciones solubles en una placa de 96 pocillos. Para iniciar la reacción se incorporaron 180 µl de DPPH[•] (74 ppm en metanol), y se midió la absorbancia a los 60 min. Para la expresión de los resultados se realizó una curva de calibración con Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, un análogo de la vitamina E) y los resultados se expresaron como µmoles de equivalentes de Trolox/g de galletita seca.

Todas las medidas se hicieron al menos por duplicado utilizando un lector de placas Fluostar Omega BMG (Ortenberg, Alemania).

- Actividad antioxidante por FRAP

El ensayo de FRAP permite medir la capacidad reductora de la muestra sobre el catión férrico (Benzie y Strain, 1996). Una vez reducido, el catión ferroso se compleja con el reactivo de FRAP que contiene el ligando tripiridil-triazina (TPTZ). Este complejo de color azul intenso presenta un máximo de absorción a 593 nm (Figura 3.10).

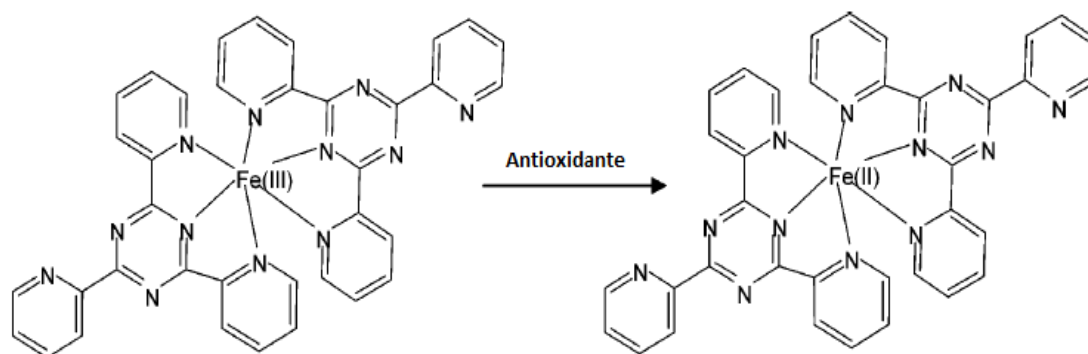


Figura 3.10. Reacción involucrada en la determinación de antioxidantes por el método de FRAP (adaptado de Prior y col., 2005)

El reactivo de FRAP se preparó a partir de 2,5 ml de reactivo de TPTZ (10 mmol TPTZ en 40 mmol HCl); 2,5 ml de FeCl_3 (20 mM) y 25 ml de buffer (300 mM de NaAc y 6 mM de HAc, pH 3,6). Este reactivo fue preparado al momento de la determinación.

Para iniciar la reacción, sobre 20 μl de las fracciones solubles apropiadamente diluidas se agregaron 1,8 mL del reactivo de trabajo de FRAP fresco. La absorbancia de la muestra se midió a los 30 min a 593 nm. Paralelamente se realizó una curva patrón de Trolox.

Los resultados se expresaron como μmoles equivalentes de Trolox/g de galletita seca. Todas las medidas se realizaron al menos por duplicado.

- Actividad antioxidante por ABTS

El ensayo cuantifica la capacidad de los antioxidantes de reducir el radical libre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (ácido 2,29-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).

El catión radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se genera a partir de la oxidación de ABTS con persulfato de potasio. El radical generado posee un máximo de absorbancia a 734 nm y luego, por la presencia de antioxidantes, se reduce volviéndose incoloro, tal como se ve en el siguiente esquema de reacción (Figura 3.11) (Re y col., 1999):

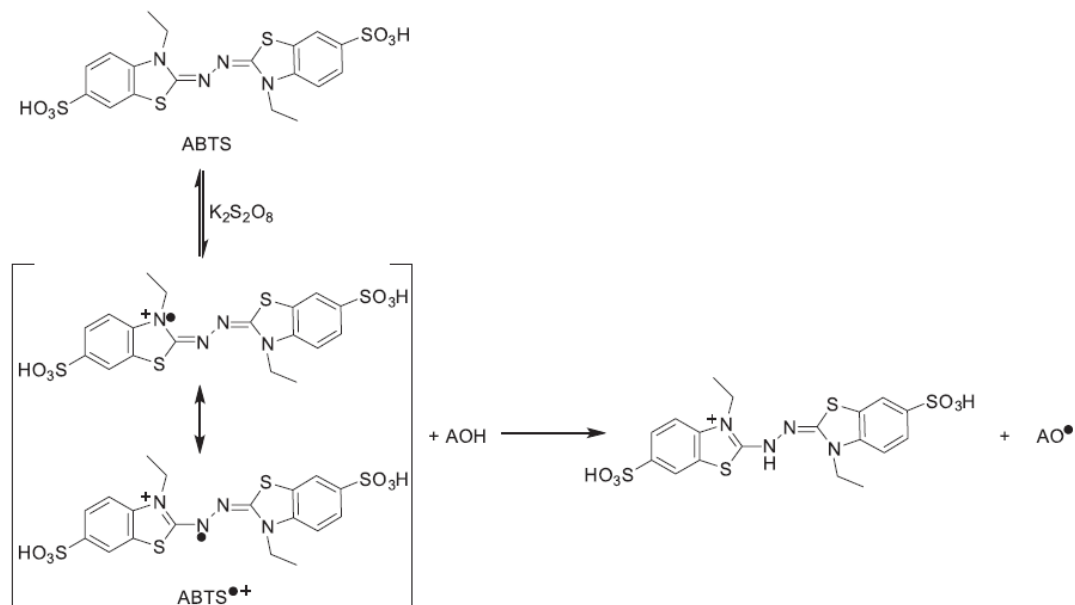


Figura 3.11. Esquema de la reacción entre el persulfato de potasio, los antioxidantes y el ABTS (adaptado de Oliveira y col., 2014)

Para generar el radical ABTS^{•+} se prepararon 5 ml de una solución de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2,45 mM en agua destilada, dejando la mezcla durante 12 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez formado el radical, la solución se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ medida a 734 nm.

El poder anti-radical se evaluó determinando el porcentaje de inhibición de ABTS en las muestras. A 20 µl de las fracciones solubles diluidas se le adicionaron 280 µl de reactivo de ABTS^{•+} recién preparado. Luego de 20 min de reacción, se midió la absorbancia a 734 nm. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado. Las muestras fueron adecuadamente diluidas hasta obtener un porcentaje de inhibición entre 20 y 80 % (Re y col., 1999). Los resultados se expresaron como µmoles de equivalentes de Trolox/g de galletita seca.

- Medida de la actividad antioxidante de las fracciones insolubles

Para poder considerar el aporte de antioxidantes remanentes en la fracción insoluble obtenida luego de la fermentación de la masa y de cada producto final obtenido a las distintas temperaturas ensayadas (100 °C, 80 min; 125 °C, 60 min y 150 °C, 30 min) (ver esquema en la Figura 3.7) se utilizó la técnica de QUENCHER (*QU*ick, *E*asy, *N*ew, *C*HEap and *R*epr**o**ducible) desarrollada por Gökmen y col. (2009). Esta metodología permite la determinación de los antioxidantes totales presentes en una muestra sólida.

El método de QUENCHER se basa en el contacto directo de la muestra molida con el reactivo de trabajo. De esta manera los antioxidantes insolubles retenidos en la matriz reaccionan con el reactivo de trabajo a pesar de estar ligados a moléculas más grandes, tal como se puede ver en el siguiente esquema (Figura 3.12):

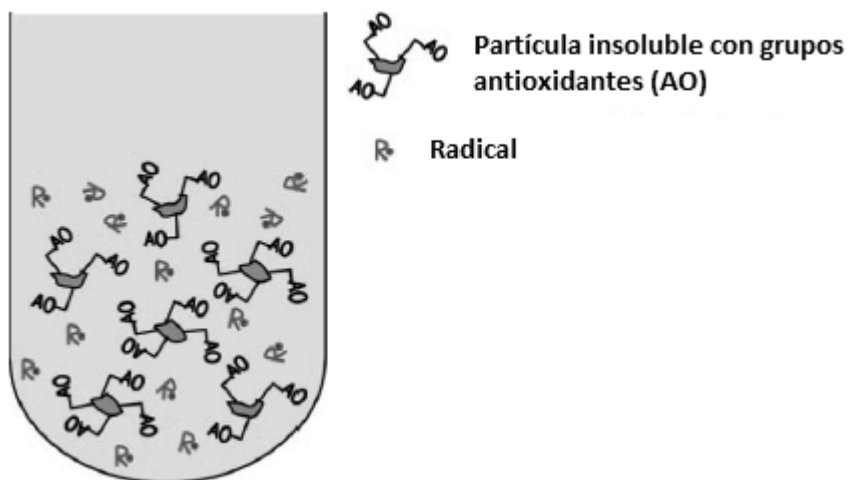


Figura 3.12. Esquema de la interacción entre los radicales libres y los compuestos antioxidantes ligados a partículas insolubles (adaptado de Serpen y col., 2007)

Para la determinación de antioxidantes totales por DPPH se utilizó el método descrito por Serpen y col. (2007) con algunas modificaciones. Las muestras insolubles liofilizadas (1,5 mg) fueron colocadas en un eppendorf. Para iniciar la reacción se agregaron 2,0 ml de reactivo DPPH (74 ppm en metanol), y se dejó la mezcla de reacción en la oscuridad durante una hora a 37 °C bajo agitación constante. Finalmente, las muestras se centrifugaron 5 min a 13000 x g (Serpen y col., 2007). La absorbancia de los sobrenadantes se determinó a 515 nm por triplicado en un equipo Fluostar Omega BMG (Ortenberg, Alemania). Los resultados se expresaron como μ moles equivalentes de Trolox/g de galletita seca.

Análogamente se repitió este procedimiento para el ensayo de FRAP (3,0 mg de muestra + 4 mL de reactivo de FRAP). En este caso también se respetó el mismo tiempo de reacción que para la determinación de antioxidantes en las fracciones solubles.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.3.4. Efecto de los compuestos de Maillard: Análisis *in vivo*

Los ensayos con animales que se incluyen en esta sección se realizaron en el Laboratorio Cardiovascular de la Cátedra de Histología, Embriología y Citología "A" de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a los lineamientos europeos de uso y cuidado de animales de laboratorio (2010-63), y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (protocolo número T 04-01-2014).

El efecto de los compuestos de Maillard *in vivo* fue evaluado sobre ratas Wistar macho. Para simular las condiciones de consumo reales, estos compuestos no fueron aislados del producto, y se les administró a los animales en forma de galletitas molidas como parte de la dieta.

Las ratas fueron divididas en 4 grupos a los que se les administró las siguientes dietas: dieta control + agua destilada; dieta control + agua con un antioxidante hidrosoluble (ácido ascórbico); dieta control parcialmente reemplazada con galletitas con un alto contenido de melanoidinas y otros compuestos de Maillard + agua destilada; y dieta control parcialmente reemplazada con galletitas con un contenido mínimo de compuestos de Maillard + agua destilada. Este último grupo se utilizó para descartar cualquier efecto relacionado con los ingredientes de las galletitas.



Durante el ensayo se evaluó la ingesta de alimento, el incremento de peso de los animales, la eficiencia alimentaria y la presión arterial. Se estudió también la capacidad prebiótica de los productos de Maillard evaluando microbiota de la materia fecal de los animales al inicio y al final del ensayo.

Una vez sacrificados los animales se les extrajo la sangre y se retuvo el suero para posteriores ensayos (capacidad antioxidante y oxidación lipídica en suero).

3.3.4.1 Preparación y análisis de las galletitas

Se prepararon galletitas utilizando el procedimiento descrito en la sección 3.3.3.1, y se hornearon a 100 °C durante 80 min, o a 150 °C por 30 min. En total se prepararon 5,2 Kg de galletitas, que fueron molidas utilizando una procesadora Philips Cucina mixer (HR 7633, Sao Paulo, Brasil). Una vez homogenizadas, se determinó el contenido de lípidos, proteínas, minerales, humedad y fibra dietaria.

- Determinación de humedad

Se determinó el contenido de humedad de las galletitas a 103 ± 3 °C tal como se describe en la sección 3.3.2.4. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada tipo de galletita (horneada a alta temperatura y a baja temperatura).

- Determinación de proteínas

La determinación del contenido de proteínas totales de las galletitas se realizó por el método de Kjeldahl (AACC 46-12.01, 1983). La muestra se digirió por medio de un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado en caliente en presencia de un catalizador (K_2SO_4 - $Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$ en proporción 10:1), utilizando un digestor (BÜCHI K-435, Suiza). Posteriormente se liberó el amoníaco por tratamiento alcalino (agregando NaOH 32% p/v), y se destiló en un equipo semiautomático (BÜCHI K-350, Suiza). El destilado se recogió en un erlenmeyer con ácido bórico 4 % p/v, que luego se tituló con H_2SO_4 valorado en presencia de indicador Mortimer (rojo de metilo/verde de bromocresol). Paralelamente se realizó un blanco (sin muestra).

La cuantificación se realizó por duplicado y los resultados se expresaron como g de proteínas/100 g de muestra, según la ecuación 3.15:

$$Proteínas (\%) = 100 \frac{(V_m - V_b)P_{eq} F N_{ácido}}{m_{muestra}} \quad Ec. 3.15$$

Donde:

V_m = volumen de ácido gastado en la titulación de la muestra (ml)

V_b = volumen de ácido gastado en la titulación del blanco (ml)

$N_{ácido}$ = normalidad del H_2SO_4

P_{eq} = peso del mili equivalente de nitrógeno (g/meq)

$m_{muestra}$ = masa de la muestra (g)

F = factor de conversión de nitrógeno a proteína (g proteína/g nitrógeno)

Como las galletitas tenían proteínas de trigo y de leche, el factor F utilizado fue el general de 6,25.

- Determinación de lípidos

Se cuantificó el contenido de lípidos totales de las galletitas utilizando el método de Soxhlet (AACC 30-25.01; 1983). Los lípidos se separaron por extracción semi continua durante 4 hs con éter de petróleo (30-65 Peb) (de Castro y Priego-Capote, 2010).

Ensayos preliminares demostraron que esta técnica presentaba los mayores porcentajes de recuperación de lípidos en galletitas (Patrignani y col., 2015^a).

- Determinación de cenizas

Se realizó la calcinación de las muestras en mufla a 500 - 550°C hasta peso constante, por duplicado (AACC 08-01, 1983).

- Determinación de fibra dietaria total

La fibra dietaria total se determinó sobre las galletitas según el método de la AACC 32-05 (2000) utilizando el kit Megazyme (MegazymeInt. Ireland Ltd., Wicklow, Ireland). A las muestras de galletitas ($1,000 \pm 0,001$ g) se les adicionó buffer fosfato (pH = 6) y se trataron a 100 °C con α -amilasa termoestable (30 min). Pasado ese tiempo, las muestras se enfriaron, se les ajustó el pH a 7,5 y se incubaron a 60 °C en presencia de proteasa (para hidrolizar proteínas) por 30 min. Finalmente el pH se reajustó a 4,5 y las muestras se incubaron con amiloglucosidasa (para hidrolizar el almidón a glucosa) por otros 30 min.

Se precipitó la fibra dietaria con etanol 95 % v/v y se dejó en reposo durante 1 hora. Pasado ese tiempo, la fibra fue filtrada utilizando celite y lavada sucesivamente con 3 alícuotas de 20 ml de etanol (78 %), 2 alícuotas de 10 ml de etanol (98 %) y dos alícuotas de 10 ml de acetona. La muestra fue secada a 105 °C y pesada.

Dado que puede quedar algo de proteína y de minerales retenido en el residuo, sobre un residuo se determinó el contenido de cenizas por calcinación en mufla a 500 - 550°C, mientras que sobre el se cuantificó el contenido de proteínas por el método de Kjeldahl descripto previamente.

El contenido de fibra dietaria total se determinó restando el contenido de proteínas y cenizas a la fibra dietaria filtrada y seca.

- Contenido de hidratos de carbono exceptuando la fibra

El contenido de hidratos de carbono se calculó por diferencia entre 100 y la suma del contenido de proteínas, lípidos, fibra dietaria, humedad y cenizas (CAA, 2013^a).

- Determinación del contenido de calcio, zinc y sodio en galletitas

Las cenizas obtenidas luego de la mineralización en mufla a 550 °C se disolvieron en ácido nítrico y se llevaron a volumen. Se determinó el contenido de minerales utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 400, Estados Unidos), con llama de aire-acetileno, ventana de 0,5 mm y longitud de onda de 422,7 nm para el calcio y de 213,9 nm para el zinc. En la solución de lectura se agregó cloruro de lantano, para evitar la interferencia del fósforo en la determinación del calcio (Perkin-Elmer, 1996). El contenido de sodio se determinó por espectrofotometría de emisión atómica (longitud de onda 589,1 nm).

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.3.4.2 Análisis de melanoidinas en galletitas

Los compuestos de Maillard presentes en las galletitas se aislaron mediante una hidrólisis enzimática seguida de ultrafiltración tal como describe Martín y col. (2009).

Se trató 1 g de galletita enzimáticamente con 30 ml de una solución de Pronasa E (Protease de *Streptomyces griseus*, SIGMA) (0,375 mg/mL) preparada en borato de sodio (0,1 M, pH=8,2). Las muestras se incubaron con la enzima durante 42 hs a 37 °C con agitación continua (Delgado Andrade y col., 2006). Finalizado el tiempo de incubación, fueron colocadas en hielo y centrifugadas a $4500 \times g$ por 10 min (centrífuga Sigma 2-16 PK Sartorius, Osterode, Alemania). La fracción soluble obtenida fue luego ultrafiltrada utilizando una membrana de polietilsulfona (5000 MW cut off) (Sartorius stedium, Goettingen, Alemania) (Figura 3.13).

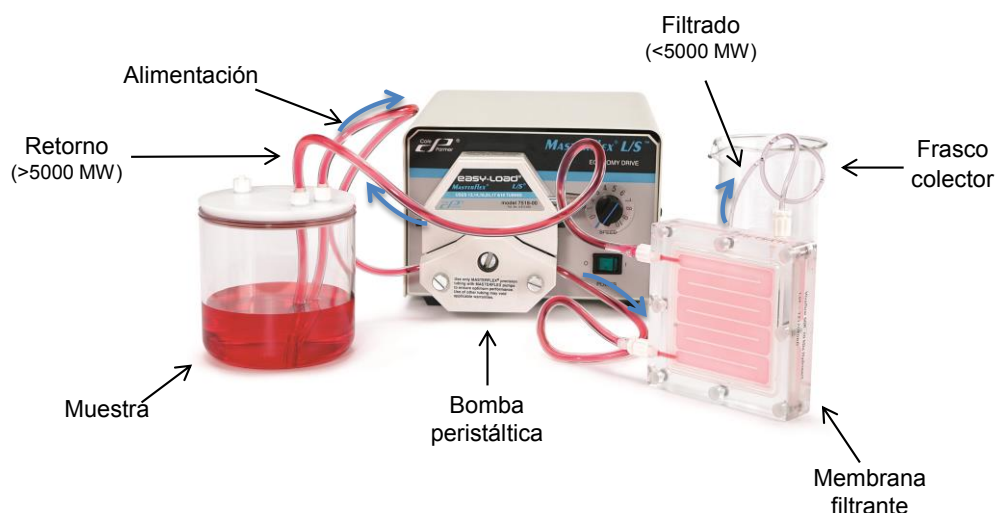


Figura 3.13. Equipo de filtrado utilizado (adaptado de <https://www.sartorius.com...>). Las flechas azules indican la dirección del flujo

Una vez finalizada la ultrafiltración, los compuestos de peso molecular superior a los 5 KDa no atravesaron el filtro se liofilizaron. Las muestras fueron solubilizadas en agua y se determinó su espectro de absorción entre 400 y 700 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV 1240-mini, Kyoto, Japón). Se considera que la absorbancia a 294 nm es un indicador de la presencia de compuestos de Maillard intermedios, mientras que los compuestos finales pueden ser detectados a 420 nm (Yu y col., 2012).

3.3.4.3 Diseño de las dietas

Las dietas fueron preparadas en la Cátedra de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires de acuerdo a los lineamientos de la American Institute of Nutrition Rodent Diets (AIN) (Revers y col., 1993). Para la confección de las dietas se consideró la composición de las galletitas, y se agregó el resto de los nutrientes (proteínas, hidratos de carbono, minerales, etc.) de manera que todas las dietas fueran isocalóricas (372 ± 8 kcal/100 g) e isoproteicas.

Se prepararon 3 dietas distintas para alimentar a los 4 grupos de ratas (dos de los grupos consumieron la misma dieta):

- Dieta Control: dieta básica AIN-93.
- Dieta GAT: dieta básica parcialmente reemplazada con galletitas horneadas a alta temperatura (39,1 g de galletita en peso seco por cada 100 g de dieta).
- Dieta GBT: dieta básica parcialmente reemplazada con galletitas horneadas a baja temperatura (39,1 g de galletita en peso seco por cada 100 g de dieta).

La composición de cada una de las dietas se detalla en la Tabla 3.2. La mezcla mineral que se menciona contenía calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, cloro, azufre, hierro, zinc, manganeso, cobre, yodo, molibdeno, selenio, cromo, flúor, níquel, silicio, boro, litio y vanadio (Revers y col., 1993).

Para las dietas parcialmente reemplazadas con galletitas, se ajustó el contenido de Zn, Na y Ca, considerando el contenido de cada uno de estos minerales en las galletitas (sección 3.3.4.1) para asegurar un aporte idéntico de estos minerales en todas las dietas.

La mezcla vitamínica incorporada a las dietas contenía ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, biotina, y vitaminas B12, K, A, E y D. La dextrina fue adicionada como carbohidrato hasta completar el kilo de dieta.

Tabla 3.2. Composición de las dietas

Composición (g/Kg de dieta)	Dieta		
	Control	GAT	GBT
Caseína (85 % proteína)	140	87	87
Mezcla mineral	35	35	35
Mezcla vitamínica	10	10	10
L-Cistina	1,8	1,8	1,8
Aceite de soja	40	7,8	7,8
Colina (ml)	7,1	7,1	7,1
Fibra	50	40,9	40,9
Galletita (g secos)	----	391	391

Una vez preparadas las dietas fueron conservadas a 4 °C hasta su uso.

3.3.4.4 Animales, mantenimiento y diseño experimental

Para evaluar el efecto de los compuestos de Maillard *in vivo* se utilizaron 24 ratas Wistar machos de 8 semanas de edad (250-300 g de peso corporal) obtenidas en el Centro Atómico Ezeiza (Buenos Aires, Argentina).

Antes de iniciar el período experimental, los animales fueron aclimatados durante una semana a las condiciones del bioterio (23 ± 5°C; ciclos luz-oscuridad de 12 horas y en jaulas galvanizadas con piso de malla). Una vez finalizado el período de adaptación, se pesaron los animales y se les midió la presión arterial para poder separarlos en 4 grupos experimentales homogéneos de 6 ratas cada uno: grupo G-CO y grupo G-ASC (alimentados con la dieta control), grupo G-GAT (alimentado con dieta GAT); G-GBT (alimentado con dieta GBT). Todos los animales tenían libre acceso al alimento y al agua de bebida. Al grupo G-ASC se le administró como antioxidante ácido ascórbico (300 mg/Kg.día) en el agua de bebida (Sönmez y col., 2005).

El consumo de la dieta fue monitoreando diariamente, por diferencia de peso del comedero. El aumento peso de los animales se midió una vez por semana durante las seis semanas que duró la experiencia. A partir del aumento de peso total de los animales (g) y del alimento total consumido a lo largo de todo el ensayo (expresado en g secos) se determinó la eficiencia del alimento (Delgado-Andrade y col., 2013^b):

$$Eficiencia\ Alimentaria = \frac{Aumento\ de\ peso\ (g)}{Alimento\ consumido\ (g\ secos)} \quad Ec. 3.16$$

- Medida de la presión arterial

Durante la primera, segunda, cuarta y sexta semana se midió la presión arterial de los animales por el método indirecto, considerando la presión arterial como la presión que se debe ejercer desde afuera del vaso para ocluirlo (Fritz y Rinaldi, 2008).

Para una óptima visualización del pulso primero se colocó a la rata 10 min en una incubadora a 40 °C para dilatar la arteria de la cola sobre la que se mediría el pulso. Para esto el animal se ubicó dentro de una incubadora con control de temperatura tal como se puede ver en la Figura 3.14.



Figura 3.14. Foto tomada durante el período de incubación del animal a 40 °C previo a la toma de presión

Luego se acomodó al animal en un inmovilizador acrílico con un soporte metálico, que se adaptaba al tamaño de la rata. El inmovilizador de acrílico tenía un orificio para la salida de la cola. Una vez introducida la rata en el dispositivo, la misma se inmovilizó ajustando una traba deslizable.

Durante las medidas se colocó al animal sobre una manta calefactora para que su temperatura corporal se mantenga estable. La cola se ubicó dentro de un manguito oclisor que se insuflaba por medio de gas comprimido hasta la desaparición del pulso de la arteria. Luego, para descomprimir, el gas era liberado; esto permitía ver la reaparición del pulso. Para el inflado y desinflado del manguito, se emplearon válvulas de entrada y salida de gas. El equipo utilizado se puede observar en la Figura 3.15.

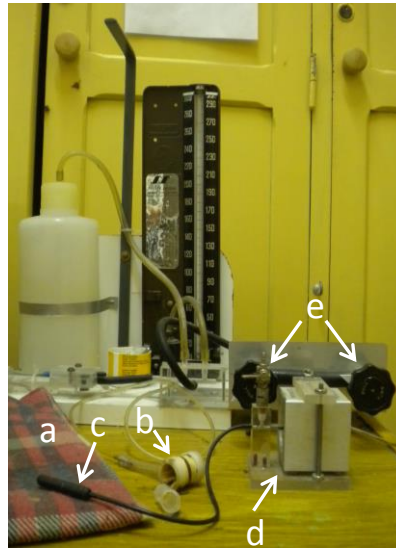


Figura 3.15. Equipo utilizado para la determinación de la presión arterial por el método indirecto. En la imagen se puede ver la manta termostatzada (a), el manguito oclisor (b) y el detector de pulso (c) que se coloca sobre la cola. Este sistema se completa con un transductor de pulso (d) que permite el registro del pulso del animal. Finalmente se puede observar el sistema de válvulas (e) que permite inflar y desinflar el manguito mediante aire comprimido. Las medidas eran visualizadas en la computadora y guardadas para un posterior análisis

El pulso del animal se registró utilizando un transductor de pulso; la señal era ampliada y registrada en la computadora mediante un sistema de adquisición de datos. Paralelamente, se midió la presión ejercida sobre la cola (que también fue ampliada) y ambas señales fueron digitalizadas en un único gráfico tal como se puede ver en la Figura 3.16. La presión arterial se determinó gráficamente como la presión que se debe ejercer sobre la cola cuando el pulso desaparece.

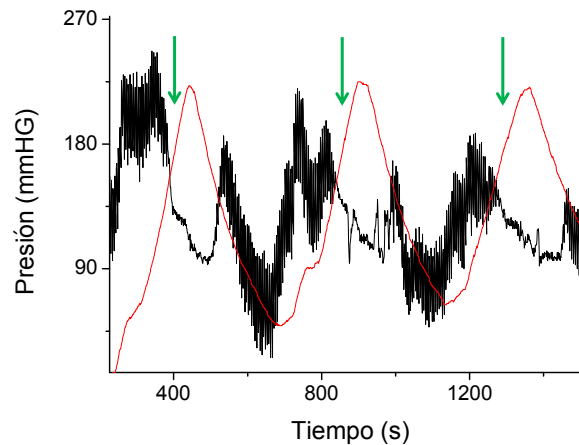


Figura 3.16. Registro on-line del pulso (líneas negras) y de la presión del manguito (línea roja). Las flechas verdes indican el momento en el que la señal del pulso se detiene.

Los valores de presión para cada animal se obtuvieron promediando al menos tres mediciones exitosas (sin perturbación) de la señal. Se consideró la medida de la presión obtenida durante el inflado del manguito, ya que ésta coincide mejor con el valor arterial intrasistólico real (Fritz, 2009).

- Humedad de la materia fecal

La materia fecal fresca de los animales fue recolectada en la última semana del ensayo utilizando un sujetador de garras. El contenido de humedad de la materia fecal se determinó tal como se describe en la Sección 3.3.2.4.

- Microbiota de homogenatos fecales

Para evaluar el efecto prebiótico de los compuestos de la reacción de Maillard se evaluó la microbiota fecal de los animales al inicio (semana 1) y al final de la experiencia (semana 6). Para esto se recogió la materia fecal fresca de los animales y se homogeneizó una cantidad perfectamente pesado ($1,000 \pm 0,005$ g) en 10 ml agua peptona (0,1 g/L) estéril. Luego se realizaron diluciones seriadas y se realizó una siembra en superficie para el recuento de microorganismos viables en dos medios distintos.

Para el recuento de mesófilos aerobios totales se utilizó agar PCA (plate count agar) que es un medio no selectivo (ANMAT, 2014). El mismo contiene extracto de levadura (2,5 g/L), tripteína (5 g/L) glucosa (1 g/L) y agar (15 g/L). Se sembró 1 ml de la dilución correspondiente sobre el medio; la alícuota se extendió utilizando perlas de vidrio estériles. Las placas fueron incubadas en condiciones aeróbicas durante 48 horas a 37 °C.

De forma similar se sembraron alícuotas en agar MRS con cisteína. Este medio se utiliza para la cuantificación de bacterias ácido lácticas y ha sido utilizado para la detección de las mismas en materia fecal (Jiménez-Escrig y col., 2003). El agar MRS contiene proteosa peptona (10 g/L), extracto de carne (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y glucosa (20 g/L), que constituyen la fuente nutritiva, ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. También contiene monoleato de sorbitán, y sales de sodio, magnesio y manganeso que proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. Contiene además citrato de amonio (2 g/L) que actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas (Lab Britania, 2015^a). Una vez sembradas las muestras se incubaron anaeróbicamente a 37 °C por 48 hs.

Finalizado el tiempo de incubación, el recuento de colonias se realizó en las placas de Petri que tenían entre 20 y 200 unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados se

expresaron como log UFC por gramo de peso seco de materia fecal. Cada determinación se realizó por duplicado sobre dos pools diferentes de heces de rata.

Las bacterias lácticas son microorganismos no esporulados, gram positivos y carecen de catalasa (Ramírez y col., 2011). Considerando esto, se procedió a una confirmación preliminar de la presencia de estas bacterias en las colonias crecidas en agar MRS.

Sobre las colonias se realizó una coloración utilizando la técnica de Gram, y se observaron los preparados utilizando un microscopio Olympus CX-31 (Tokyo, Japón).

La muestra de colonia fresca fue extendida, secada y fijada sobre un portaobjetos. Se cubrió 2 minutos con cristal violeta (10 g/L), se escurrió y luego se cubrió con solución de Lugol (10 g I₂ + 20 g KI por litro de agua destilada) durante 30 s. Finalizado este tiempo se escurrió y se volvió a tratar la muestra con Lugol (30 s). Luego se decoloró con alcohol acetona (10 s) y se lavó con abundante agua. Sobre la muestra se colocó safranina (0,5% p/V) durante 2 min. Las muestras se secaron y se observaron al microscopio.

Luego del procedimiento, las bacterias Gram positivas se observan de color violeta, mientras que las Gram negativas se ven rojas.

La catalasa es una enzima que se encuentra en la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Utiliza como sustrato H₂O₂, que descompone generando oxígeno y agua. Para el ensayo se tomó con un ansa una muestra de las colonias crecidas en medio MRS y se colocó sobre un portaobjetos; luego se agregaron unas gotas de agua oxigenada y se observó si había desprendimiento de gas (formación de burbujas).

- Absorción aparente de minerales

Durante la última semana se determinó el consumo de alimento y se recogieron las heces de los animales para calcular el porcentaje de absorción de minerales.

Las dietas y heces se calcinaron tal como se describe en la sección (3.3.4.1) hasta peso constante. La absorción aparente de minerales se determinó considerando los minerales consumidos (minerales_c) y los minerales excretados (minerales_e) utilizando la siguiente ecuación (Jiménez-Escrig y col., 2013):

$$\text{Absorción aparente de minerales (\%)} = 100 \frac{\text{minerales}_c(g) - \text{minerales}_e(g)}{\text{minerales}_c(g)} \quad \text{Ec. 3.17}$$

Las cenizas obtenidas se disolvieron en ácido nítrico y se utilizaron para determinar la concentración de zinc mediante la técnica ya descrita en la sección 3.3.4.1 para cuantificación de este mineral en las dietas.

La absorción aparente de zinc se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación, donde zinc_c indica el zinc consumido (g) y zinc_e indica el zinc excretado (g):

$$\text{Absorción aparente de zinc (\%)} = 100 \frac{\text{zinc}_c (g) - \text{zinc}_e (g)}{\text{zinc}_c (g)} \quad \text{Ec. 3.18}$$

3.3.4.5 Sacrificio de las ratas

Al final del período experimental, las ratas fueron anestesiadas con diazepam (0,05 mg/Kg de peso corporal) y pentobarbital (25 mg/Kg de peso corporal). A continuación, los animales se sacrificaron por desangrado desde la aorta abdominal. Primero se realizó una incisión en la zona de la tráquea y se canuló la misma para conectar al animal a un respirador artificial. Luego se realizó una incisión en la zona abdominal, se ubicó la aorta, se la aisló con hilos y se detuvo la circulación sanguínea colocando un clamp. Cuidadosamente se realizó un corte en la aorta y se colocó la cánula (Figura 3.17). Se liberó el clamp y la sangre drenada fue recogida en un tubo falcon de 15 ml conteniendo unas gotas de heparina.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos y se separó el suero mediante centrifugación a baja velocidad (1000 x g, 10 min). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis.

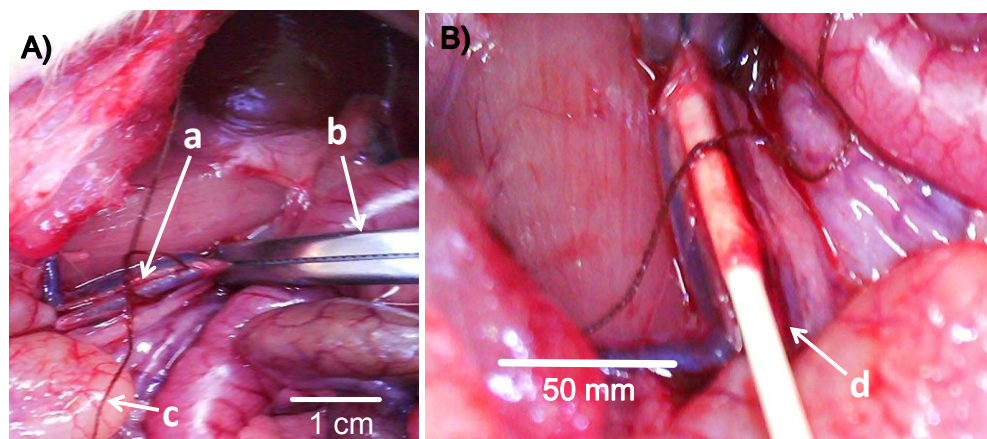


Figura 3.17. Fotos tomadas durante la canulación de los animales. En la imagen A se puede observar la aorta abdominal (a), el clamp (b) y el hilo sujetador (c). En la imagen B se puede observar la cánula ya colocada (d)

- Poder antioxidante en el suero

El poder antioxidante en el suero se determinó mediante dos técnicas distintas: ABTS y FRAP (Jimenez-Escrig y col., 2003), siguiendo el protocolo ya descrito previamente en la sección 3.3.3.5.

En el caso de la actividad antioxidante cuantificada por el método de ABTS, en lugar de utilizar etanol para diluir el reactivo se utilizó buffer fosfato (5 mM) pH 7,4 (Re y col., 1999).

La técnica de DPPH no es adecuada para la determinación de la capacidad antioxidante en plasma, ya que las proteínas precipitan en el medio alcohólico donde se solubiliza el reactivo (por lo que fue descartada en estas determinaciones) (Magalhães y col., 2008).

- Determinación de compuestos reactivos al TBA

Para determinar la extensión de la oxidación lipídica sobre las muestras de plasma se utilizaron tubos de vidrio de 10 ml en los que se colocaron 200 μ L de suero, 10 μ L de butilhidroxitolueno (BHT) (2,2 g/L), 10 μ L de FeCl_3 (2,7 g/L) (se utiliza como catalizador de la reacción), 1 ml de buffer HCl-Glicina (pH 3,5) y 1 ml de solución recién preparada de ácido tiobarbitúrico (TBA) (5 g/L en SDS 0,3 %). Las muestras se llevaron a 5 °C durante 30 min y luego se calentaron a 95 °C durante 60 min para el desarrollo del color, tapando los tubos con bolitas de vidrio. Finalizado el tiempo de reacción los tubos se llevaron a un baño de hielo durante 10 min para enfriarlos. Se tomó una alícuota de 0,5 ml de la mezcla de reacción y se colocó en un eppendorf conteniendo 400 μ L de butanol. Las muestras se agitaron a 1600 rpm por 30 s y luego se centrifugaron a 4000 \times g por 5 min. Se recogió la capa superior de butanol en un tubo limpio y se midió la absorbancia a 532 nm. Paralelamente se realizaron blancos reemplazando el suero por 200 μ L de H_2O destilada (Estepa y col., 2009).

La curva de calibración se realizó con una solución de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (83,5 μ mol/L). Este patrón se hidroliza fácilmente en las condiciones de reacción liberando malonaldehído (MDA) en relación equimolar (Sinnhuber y col., 1958). Los resultados se expresaron como nmol MDA/ ml de suero.

3.3.5 Compuestos de Maillard como conservantes en galletitas

3.3.5.1 Conservación de galletitas horneadas a distintas temperaturas

Se evaluó el posible efecto de los compuestos de Maillard de retardar la oxidación lipídica de los aceites de las galletitas y aumentar el tiempo de vida útil del producto final.

Para esto se prepararon galletitas tal como se detalla en la sección 3.3.4.1 y se almacenaron en las mismas condiciones que en la sección 3.3.2.2 tomando muestras cada 4 semanas durante los 6 meses que duró la experiencia.

3.3.5.2 Evaluación de compuestos primarios de oxidación lipídica

Para la extracción de los lípidos se colocaron 7,6 g de galletitas molidas en un vaso de precipitado y se agregaron 30 ml de éter de petróleo 30-65 Peb. Luego de 30 min de agitación con bazo magnético las muestras fueron filtradas y el éter fue recogido en una probeta. Sobre el remanente sólido se repitió el proceso (Patrignani y col., 2015^a). Las fracciones de éter fueron recolectadas y trasvasadas a un vaso de precipitado previamente tarado. El éter fue eliminado por evaporación a temperatura ambiente en oscuridad.

Se utilizó esta técnica por su simplicidad y por su excelente eficiencia en la extracción de los lípidos. Además, el contenido de peróxidos determinado sobre los aceites extraídos con esta técnica es comparable al de los aceites extraídos con la técnica descrita en la sección 3.3.2.7 (Patrignani y col., 2015^a).

La determinación de compuestos primarios de oxidación lipídica se realizó tal como se describe en la sección 3.3.2.7.

3.3.5.3 Determinación del perfil lipídico

La identificación y cuantificación de ácidos grasos de los aceites extraídos antes y después del tiempo de conservación (6 meses) se realizó por cromatografía gaseosa.

Las muestras de aceite extraídas fueron derivatizadas por el método de Morrison y Smith (1964), y luego analizadas por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Hewlett Packard 6890, utilizando una columna capilar de 50 metros de longitud y 0,25 mm de diámetro Chromopack CP Sil 88, con el siguiente protocolo: 3 min a una temperatura inicial de 185 °C, una rampa de 3 °C/min y 25 min a una temperatura final de 230 °C. Los ácidos grasos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención relativos respecto de los estándares comerciales (Valenzuela y col., 2003).

3.3.6 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los distintos factores se realizó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial o monofactorial según correspondiera. Para comparar entre medias se utilizó el test de “mínimas diferencias significativas” (LSD). En todos los casos, el nivel de significación elegido fue del 95 %. Estos análisis se realizaron mediante el software estadístico InfoStat, 2012 (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

Para evaluar la relación entre las variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (Delgado-Andrade y col., 2013^b). Este coeficiente es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables y no depende de las unidades de medida de las variables originales. Asume valores en el intervalo [-1;1] y el signo indica la dirección de la asociación. El coeficiente de Pearson representa la covarianza de los valores muestrales estandarizados. Para las variables j-ésima y k-ésima se define como:

$$r_{jk} = \frac{S_{jk}}{\sqrt{S_j^2 S_k^2}} \quad \text{Ec. 3.19}$$

Donde S_{jk} es la covarianza entre la variable j y la variable k; mientras que S_j^2 y S_k^2 son las varianzas de las variables j y k respectivamente (Di Rienzo y col., 2014).

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Selección del aceite

3.4.1.1 Estabilidad de aceites vegetales frente a la oxidación

Los alimentos como las galletitas suelen ser ricos en ácidos grasos saturados y grasas *trans*, ya que habitualmente se preparan con grasas animales o aceites vegetales hidrogenados. Esto está fuera de toda recomendación nutricional por el riesgo a la salud que implica el consumo de estas grasas. Los aceites vegetales, en cambio, ricos en ácidos grasos insaturados son más recomendados desde el punto de vista nutricional, pero presentan desventajas desde el punto de vista de su estabilidad, ya que a mayor grado de insaturación más susceptible es el aceite a la oxidación lipídica (Valenzuela y col., 2003). La estabilidad a la oxidación lipídica de aceites o grasas puede ser analizada mediante un ensayo de oxidación acelerada en condiciones estandarizadas.

Se evaluaron tres posibles aceites para la preparación de galletitas: aceite de maíz, aceite de girasol (ricos en ácidos grasos poliinsaturados) y aceite de girasol alto oleico (rico en ácidos grasos monoinsaturados). La estabilidad oxidativa de los distintos aceites se realizó evaluando los tiempos de inducción (Ti) de cada uno, mediante un equipo Rancimat.

Tal como se puede ver en la Tabla 3.3, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el Ti de los distintos aceites.

Tabla 3.3. Tiempo de inducción obtenido para los distintos aceites a 110°C.

	Tiempo de inducción (horas)
Aceite de maíz	11,4 ± 0,2 ^b
Aceite de girasol	2,9 ± 0,2 ^a
Aceite de girasol alto oleico	27,3 ± 0,4 ^c

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. Supraíndices iguales en la misma columna indican que no hay diferencias significativas entre las medias ($P > 0,05$).

El aceite de girasol alto oleico resultó ser el más estable a la oxidación lipídica, seguido por el aceite de maíz, siendo el aceite de girasol convencional el más susceptible a la oxidación (Tabla 3.3). Anwar y col. (2003) evaluaron los Ti de distintos aceites a diferentes temperaturas, y encontraron que el tiempo de oxidación a 110 °C de grasas extraídas de galletitas dulces era de 9,48 horas, similar al obtenido en este trabajo para el aceite de maíz y muy superior al obtenido para el aceite de girasol convencional (2,9 horas). Por otro lado, el Ti del aceite de girasol alto oleico fue de 27,3 horas, que resultó similar a los Ti encontrados por Anwar y col.

(2003) en shortenings industriales. Se pudo confirmar entonces que el aceite de girasol alto oleico es casi tan resistente a la oxidación como los aceites hidrogenados o la grasa vacuna, ambos con un alto contenido en ácidos grasos saturados (Valenzuela y col., 2003).

La velocidad de oxidación lipídica depende de la estructura de los ácidos grasos: los ácidos grasos saturados a temperatura ambiente prácticamente no sufren oxidación, mientras que en los ácidos grasos insaturados la oxidación es mayor, y aumenta con el número de dobles enlaces (Lupano, 2013). Entre los aceites ensayados, el aceite de girasol contenía mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que el aceite de girasol alto oleico fue el que presentaba mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados, tal como se puede ver en la Figura 3.18.

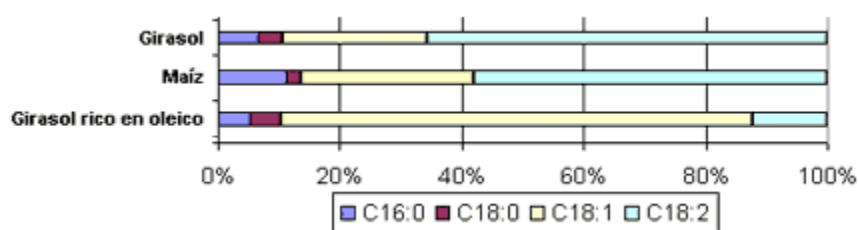


Figura 3.18. Perfil de ácidos grasos de los aceites utilizados en las galletitas
(adaptada de <https://www.3tres3.com/nutricion/...>)

3.4.1.2 Oxidación lipídica durante el tiempo de conservación de las galletitas

El uso de aceites vegetales en reemplazo de grasas o aceites hidrogenados para la preparación de galletitas es una posible estrategia para mejorar el perfil de ácidos grasos de los alimentos que consumen los jóvenes en nuestro país (Peterson y col., 2004). Sin embargo, los aceites, ricos en ácidos grasos insaturados, como mencionamos anteriormente, son más susceptibles a la oxidación, que puede derivar en sabores y olores indeseables. Es entonces muy importante tener un control de la oxidación lipídica del producto durante su tiempo de conservación.

Se cuantificó el nivel de oxidación lipídica durante el tiempo de conservación de las galletitas preparadas con distintos aceites mediante dos ensayos: determinación del valor de peróxidos (PV), y medida de los compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBA), expresados como malonaldehído (MDA).

El PV obtenido de los distintos aceites extraídos de las galletitas durante el tiempo de conservación fue significativamente diferente ($P \leq 0,05$) (Figura 3.19).

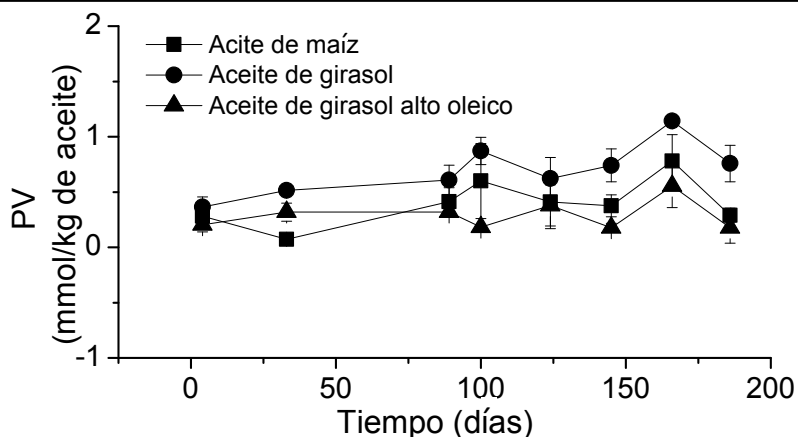


Figura 3.19. Contenido de peróxidos (expresado como mmol de oxígeno por kg) en aceites extraídos de galletitas preparadas con aceite de maíz, aceite de girasol tradicional y aceite de girasol alto oleico, en función del tiempo de almacenamiento a 20 °C. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Las galletitas preparadas con aceite de girasol presentaron los mayores niveles de peróxidos, en concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo de oxidación acelerada. Sin embargo, este valor fue menor que el obtenido por otros autores: Mildner-Szkudlarz y col (2009) encontraron valores de PV de hasta 6 mmol/Kg de aceite en galletitas preparadas con margarina conservadas a 20 °C, mientras que Mesías y col. (2015) encontraron valores muy superiores, del orden de los 2000 mmol de oxígeno/Kg de aceite en galletitas preparadas con aceite de girasol convencional. Por otro lado, el contenido de malonaldehído fue medido por g de galletita seca, y no superó los 15,8 nmol/g, sin encontrar diferencias significativas entre las galletitas preparadas con distintos aceites ($P > 0,05$). Mišan y col. (2011) establecieron que valores de MDA menores a 20 nmol/g de muestra seca podían ser considerados bajos en galletas. Estos resultados estarían indicando que en estas galletitas, el nivel de oxidación lipídica, si bien aumenta con el nivel de insaturación del aceite utilizado, es en general bajo y no limitaría el tiempo de vida útil del producto en seis meses de almacenamiento.

El aceite de girasol es el más rico en ácidos grasos poliinsaturados, lo que explica el mayor PV encontrado durante el tiempo de conservación, al igual que su menor estabilidad a la oxidación. Esto sugiere que el aceite de girasol convencional no sería adecuado para la formulación de galletitas. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Caponio y col. (2009), quienes estudiaron el efecto de margarinas con distinto perfil de ácidos grasos, sobre la estabilidad oxidativa de galletitas en función del tiempo de conservación. Estos autores encontraron un mayor nivel de oxidación en los productos que contenían niveles superiores de ácidos grasos insaturados.

3.4.1.3 Evolución de la humedad y la a_w

La absorción de humedad durante el almacenamiento es uno de los principales cambios físicos que pueden sufrir las galletitas. La absorción de humedad puede explicarse por la naturaleza higroscópica de las galletitas, las condiciones de almacenamiento (humedad ambiente, temperatura, etc), y las características de permeabilidad del envase utilizado (Nagi y col., 2012). El resultado de esto es un aumento en la actividad acuosa que disminuye el tiempo de vida útil del producto.

El contenido de humedad de las galletitas envasadas en polipropileno aumentó durante el tiempo de almacenamiento a 20 °C ($P \leq 0,05$). Hasta el día 89 las galletitas tenían un contenido de humedad menor al 8,5 %, luego la humedad aumentó hasta llegar a valores de 10,5 % al final del ensayo (datos no mostrados).

La actividad acuosa (a_w) de las galletitas también aumentó significativamente ($P \leq 0,05$), hasta alcanzar luego de 124 días una a_w de 0,65 (Figura 3.20). No se encontraron diferencias significativas en la a_w de las galletitas preparadas con distintos aceites durante todo el ensayo ($P > 0,05$).

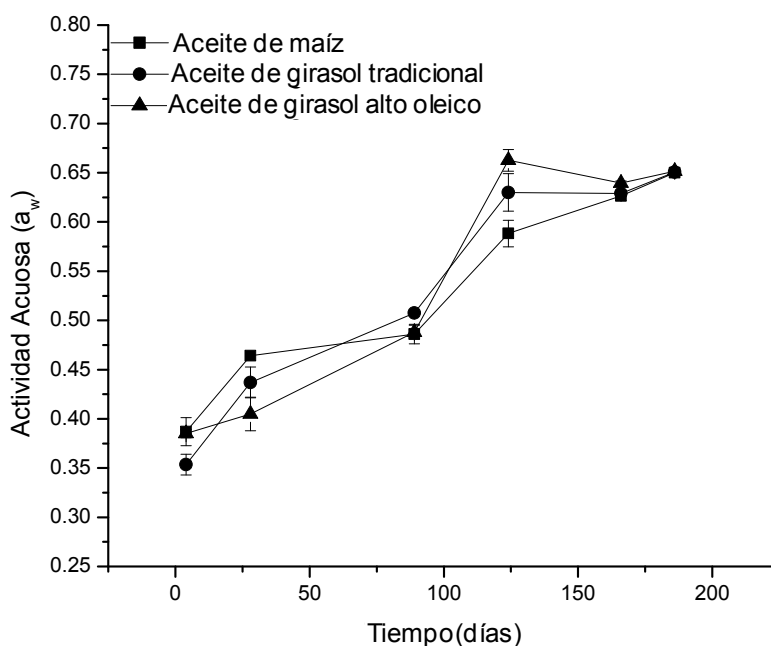


Figura 3.20. Actividad acuosa de galletitas preparadas con aceite de maíz, aceite de girasol tradicional y aceite de girasol alto oleico, en función del tiempo de almacenamiento a 20°C. Las barras verticales indican la desviación estándar.

La absorción de humedad es probablemente el factor más importante a la hora de evaluar el tiempo de vida útil de las galletitas, ya que define no sólo la estabilidad microbiológica

del producto sino también su crocancia (Hough y col., 2001; Huchet y col., 2013). A pesar de que la actividad acuosa final obtenida durante el ensayo resultó lo suficientemente baja como para inhibir el crecimiento de microorganismos ($a_w = 0,65$), estudios realizados por Hough y col. (2001) indican que cuando la actividad acuosa de las galletitas aumenta desde 0,4 hasta 0,6 la crocancia del producto puede sufrir una fuerte disminución, volviéndola inaceptable para los consumidores.

3.4.1.4 Color

Durante el tiempo de conservación el color de productos como las galletitas y las tortas puede verse modificado. Esto puede deberse a reacciones de pardeamiento no enzimático, oxidación lipídica, o a la floración de la fase grasa por fluctuaciones en la temperatura de conservación (Petersen y col., 1999; Zamora e Hidalgo, 2005). Este último defecto no es habitual en galletas y depende principalmente del tipo de fase grasa utilizada (Manley, 1998). Si bien el pardeamiento no enzimático a temperatura ambiente se desarrolla lentamente, en productos de prolongada vida útil como leche en polvo o los cereales para niños puede modificar no sólo su color sino también su flavor (Valero y col., 2001; Ramírez-Jiménez y col., 2003). Fue por esto que se incluyó en este análisis el parámetro BI definido en la ecuación 3.11.

En las condiciones del ensayo el color de las galletitas no se modificó durante el tiempo de conservación (Figura 3.21): no se encontraron diferencias significativas en los parámetros L^* , croma, ni BI ($P > 0,05$). Las galletitas preparadas con distintos aceites tampoco presentaron diferencias significativas en su color ($P > 0,05$).

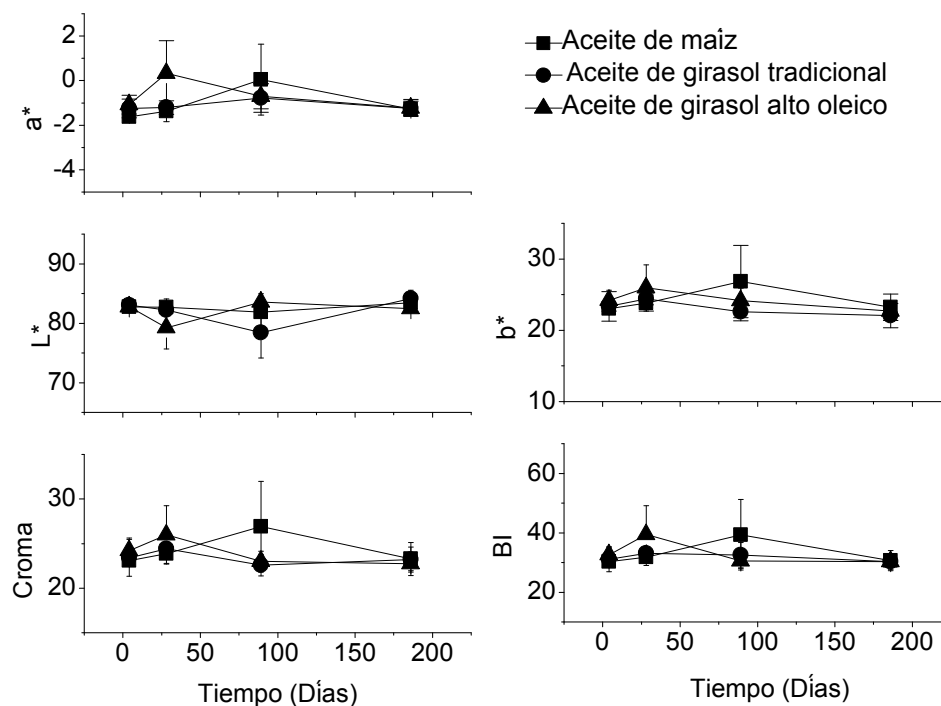


Figura 3.21. Parámetros de color de galletitas preparadas con aceite de maíz, aceite de girasol tradicional y aceite de girasol alto oleico. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Este resultado se puede atribuir a la baja oxidación lipídica sufrida por las muestras durante el ensayo, la baja cantidad de aceite utilizada para preparar las galletitas, y también porque a 20 °C las reacciones de pardeamiento no enzimático se desarrollan a baja velocidad.

En concordancia con estos resultados, Hozova y col. (1997) estudiaron la evolución de los parámetros de color en galletitas de amaranto durante 4 meses en condiciones de laboratorio ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa = $62 \pm 1\%$) envasadas en películas de celofán. En este ensayo se evaluó el color del producto, sin encontrarse diferencias significativas en este parámetro durante el tiempo de conservación. Por otra parte, Bajaj y col. (2006) analizaron la evolución del color de galletitas con menta envasadas en poliéster polimetalizado/polilaminado, conservadas a temperatura ambiente durante 5 meses. En dicho ensayo, tampoco se encontraron diferencias significativas en el color de estas galletitas durante el tiempo de conservación.

Se podría concluir entonces que en 6 meses de conservación en un envase de polipropileno y a una temperatura de 20 °C, el color de las galletitas no se ve modificado.

3.4.1.5 Textura de las galletitas durante el tiempo de conservación

Durante el tiempo de conservación el módulo de Young y el estrés de Fractura de las galletitas se modificaron significativamente ($P \leq 0,05$) (Figura 3.22).

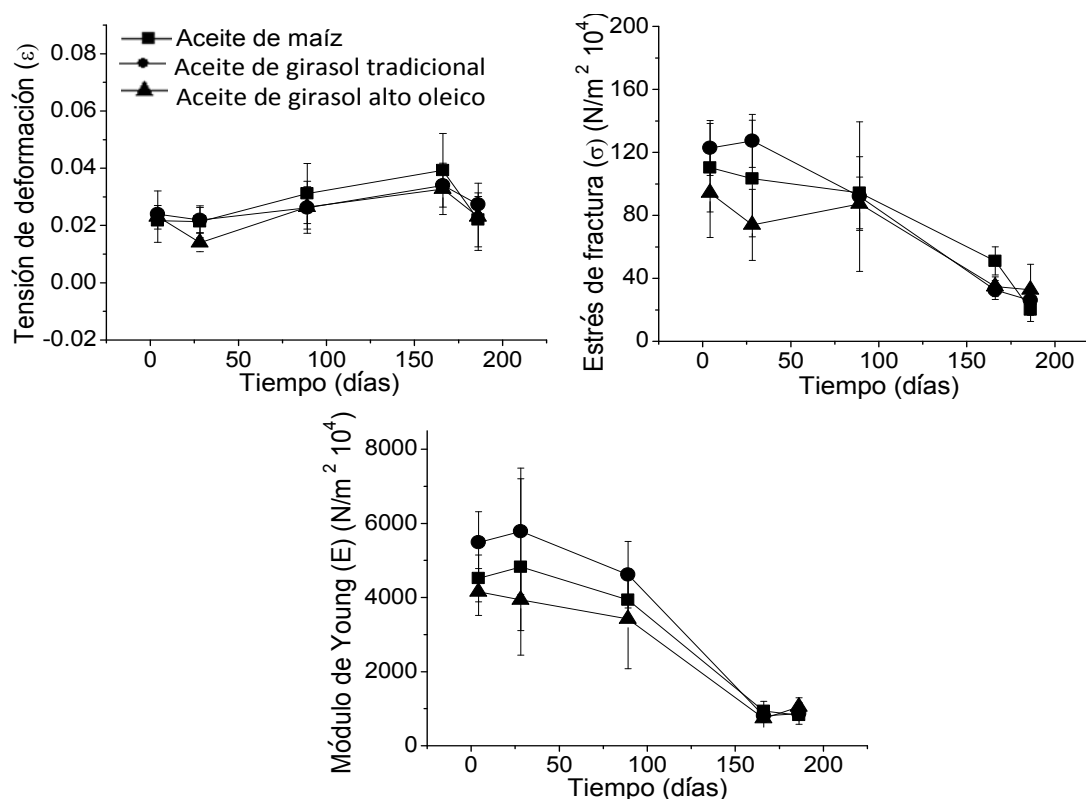


Figura 3.22. Parámetros de textura de galletitas preparadas con aceite de maíz, aceite de girasol tradicional y aceite de girasol alto oleico, en función del tiempo de conservación a 20°C. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Luego de 100 días de almacenamiento las galletitas se volvieron más frágiles, con mayor susceptibilidad a la ruptura, de acuerdo a la disminución observada tanto del estrés de fractura como del módulo de Young (Figura 3.22). Esto se puede relacionar con la absorción de humedad sufrida por el producto durante el tiempo de conservación. Al aumentar la a_w de los alimentos, se modifica la resistencia del material. La humedad absorbida genera un efecto plastificante en el producto, el cual se vuelve más fácilmente deformable, a la vez que la movilidad del agua aumenta (Martínez-Navarrete y col., 2004).

Es interesante destacar que las galletitas preparadas con distintos aceites presentaron diferencias significativas en el estrés de fractura y en el módulo de Young ($P \leq 0,05$), a pesar de que la actividad acuosa de los productos era idéntica (Figura 3.20). Tal como se puede ver en la Figura 3.22 las galletitas preparadas con aceite de girasol resultaron ser las más duras y con mayor módulo de Young.

En galletitas recién horneadas con valores similares de actividad acuosa se encontró una relación lineal entre el índice de peróxidos (PV) de los aceites extraídos y el estrés de fractura ($r^2 = 0,86$). Además, se encontró la misma tendencia entre el módulo de Young y el PV. Este resultado sugiere que existe una relación entre la textura de las galletitas y el PV del producto. En consistencia con estos resultados, otros autores mencionan la relación que puede existir entre la oxidación lipídica y la textura de los alimentos (Zamora e Hidalgo, 2005). Los lípidos oxidados pueden entrecruzarse con las proteínas modificando la textura del producto y su funcionalidad (Eriksson, 1982, Estévez y col., 2005). Por otro lado, estudios realizados por Toyosaki (2007) mostraron el efecto de los hidroperóxidos durante la fermentación de la masa; estos autores encontraron que el ácido linoleico oxidado puede interaccionar con la red de gluten cambiando su estructura y generando una red más compacta.

Basándonos en esta teoría se pudo desarrollar un modelo matemático que resultó satisfactorio para la descripción del módulo de Young y del estrés de fractura como funciones del PV y la actividad acuosa. Este modelo mostró que, si bien la textura de las galletitas durante el tiempo de conservación no sólo se relaciona con el incremento de humedad, sino también con el tipo de aceite y su grado de oxidación, este segundo efecto es mínimo al compararlo con el primero. Estos resultados han sido publicados en una revista internacional con referato (Patrignani y col., 2014)

Se podría concluir entonces que, debido a la gran higroscopicidad de las galletitas, se necesita un envase totalmente impermeable al vapor de agua para asegurar la alta calidad del producto durante su tiempo de conservación.

3.4.2 Efecto de la cocción: reacción de Maillard en galletitas

3.4.2.1 Evolución del color en galletitas durante el horneado

En las galletitas el color es en gran medida el resultado de la compleja serie de reacciones de Maillard. La extensión de la reacción de Maillard depende de distintos factores, como la temperatura, la actividad acuosa, el pH, el contenido de humedad y la composición del producto. En general, se acepta que la mayor velocidad de la reacción de Maillard se alcanza a actividades acuosas entre 0,6 y 0,85, y es favorecida a pH alcalinos (Morales y Van Boekel, 1997). El color es un factor clave a la hora de definir la calidad y aceptabilidad de un producto (Lara y col., 2011), ya que es el primer parámetro que el consumidor percibe y, en productos como los panificados, influye fuertemente en la intención de consumo (Purlis, 2010).

Durante el tiempo de cocción de las galletitas se midió el color y se determinaron los parámetros relacionados con el pardeamiento no enzimático según referencias bibliográficas: BI, L*, YI y ΔE . Los resultados se pueden ver en la Figura 3.23.

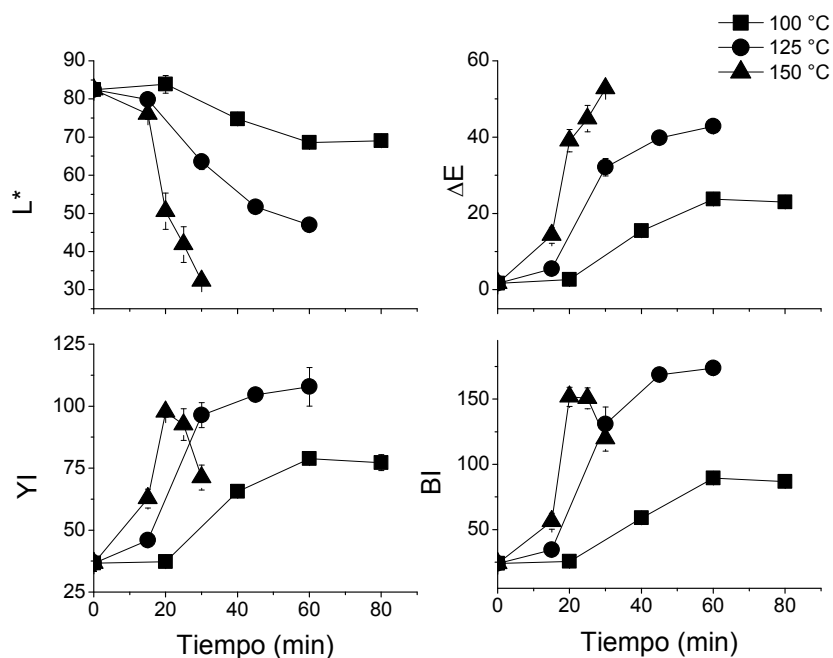


Figura 3.23. Evolución de los parámetros de color (L*, ΔE , YI y BI) de las galletitas preparadas a distintas temperaturas (100, 125 y 150 °C), en función del tiempo de cocción. Las barras verticales indican la desviación estándar.

El parámetro L* indica la luminosidad; este parámetro disminuye a medida que se generan compuestos oscuros como resultado del pardeamiento durante la cocción. Se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas de horneado, obteniéndose

galletitas más oscuras al utilizar mayores temperaturas ($P \leq 0,05$). Otros autores ya habían demostrado que durante el horneado el valor de L^* de productos como el pan disminuye con el aumento de la temperatura del horno, observándose además un mayor pardeamiento cuando se utiliza un horno con convección (Purlis y Salvadori, 2007). Shibukaway col. (1989) evaluaron el efecto de la transferencia de calor por radiación y convección sobre el desarrollo del color de las galletitas durante el horneado, y encontraron un leve aumento del parámetro L^* al comienzo de la cocción. Otros autores han observado el mismo comportamiento al inicio del calentamiento de la leche, y lo adjudicaron a la desnaturalización y asociación de las proteínas del suero con las micelas de caseína (Morales y Van Boekel, 1998). En los tiempos analizados, si bien se observó un leve aumento de L^* al comienzo de la cocción, esta diferencia no resultó significativa ($P > 0,05$).

El parámetro ΔE evalúa la diferencia entre un color de referencia (en este caso la masa de la galletita) y los distintos valores de color medidos durante el proceso de cocción, y está principalmente influenciado por el parámetro L^* (Morales y van Boekel, 1998, Gökmen y Sügüt, 2007). El aumento de este parámetro con el tiempo de cocción indica una mayor diferencia de color causada por el pardeamiento no enzimático. El análisis estadístico mostró que el uso de altas temperaturas generó un producto con una mayor diferencia de color que el obtenido a bajas temperaturas ($P \leq 0,05$). Nuevamente, no se observaron diferencias significativas en este parámetro para los primeros minutos de cocción a bajas temperaturas ($P > 0,05$), pero luego el ΔE aumentó significativamente. Es necesario tener en cuenta que las reacciones de Maillard se ven favorecidas a humedades intermedias, y esta condición se da en la superficie de la galletita cuando comienza a secarse durante la cocción. Zanoni y col. (1995) utilizaron el parámetro ΔE para modelar la evolución del color del pan durante el horneado entre los 200 y los 250 °C. Estos autores encontraron que para todas las temperaturas utilizadas, el valor ΔE tendía asintóticamente a $\Delta E_{\infty} = 52$. Las galletitas, en cambio, presentaron mayores valores de este parámetro al utilizar temperaturas de 150 °C, probablemente debido a que las galletas contienen mayor cantidad de productos de Maillard que la corteza del pan (Pastoriza de la Cueva y Rufián-Henares, 2014).

El parámetro YI (yellowing index) fue propuesto por Francis y Clydesdale en 1975 y se utilizó como un indicador de la intensidad del tostado; luego se usó para evaluar los cambios de color generados durante la cocción de productos lácteos (Rufián-Henares y col., 2006). Delgado-Andrade y col. (2010^b) utilizaron este parámetro para evaluar el desarrollo de las reacciones de Maillard en distintos alimentos. Estos autores encontraron que el uso de tratamientos térmicos severos generaba un mayor valor del YI en productos como carnes y papas fritas. La significativa disminución ($P \leq 0,05$) de este parámetro a los 30 min de cocción a

150 °C es probablemente el resultado de la disminución del parámetro b^* . Morales y Jiménez-Pérez (2001) también observaron este comportamiento en sistemas modelo, preparados a partir de glucosa/lactosa y lisina/alanina/glicina. Al utilizar prolongados tiempos de calentamiento, estos autores encontraron que el color de las mezclas evolucionaba progresivamente a colores más rojizos (mayor a^*) y azules (menor b^*).

El parámetro BI fue analizado por Isleroglu y col. (2012) en distintos tipos de hornos a diferentes temperaturas. Estos autores encontraron que los datos experimentales del BI durante el desarrollo del color se ajustaban a una reacción de primer orden, y que los valores obtenidos para el BI aumentaban con la temperatura de horneado. Además, encontraron buenas correlaciones entre el valor de este parámetro y el contenido de productos derivados de la reacción de Maillard. Tal como se puede ver en la Figura 3.23, el parámetro BI mostró una tendencia similar a la del YI. El parámetro BI aumentó significativamente durante el tiempo de cocción para todas las muestras ($P \leq 0,05$) hasta finalmente estabilizarse en un valor máximo al utilizarse temperaturas de 100 y 125°C. Cuando se hornearon galletitas a 150 °C, en cambio, este valor sufrió un significativo descenso al utilizar tiempos de cocción de 30 min, probablemente también debido a la disminución del parámetro b^* .

3.4.2.2 Generación de antioxidantes

Varios autores han probado la actividad antioxidante que poseen compuestos presentes naturalmente en los alimentos, como los compuestos fenólicos, el ácido ascórbico, los carotenoides, la vitamina E y los compuestos generados durante el procesado de los alimentos, como los compuestos generados en la reacción de Maillard (McClements y Decker, 2010). Estos compuestos han demostrado poseer la capacidad de prevenir ciertas enfermedades, y para cuantificarlos, al no haber un método estandarizado, es necesario utilizar distintas metodologías. Es por esto que en el presente trabajo se utilizaron tres técnicas para medir capacidad antioxidante: DPPH, FRAP y ABTS.

Luego de la digestión seguida por la fermentación *in vitro* se obtuvieron distintas fracciones sobre las que se determinó la capacidad antioxidante: dos fracciones solubles y una fracción insoluble (el precipitado liofilizado obtenido luego de la fermentación). El primer paso para que un antioxidante se encuentre biodisponible, es decir que el mismo pueda alcanzar la circulación a partir del tracto intestinal, es que éste se encuentre bioaccesible (que pueda liberarse desde la matriz al tracto intestinal) (Perales y col., 2008). Las fracciones solubles obtenidas luego de la digestión y la fermentación se consideraron fracciones bioaccesibles y potencialmente biodisponibles, dependiendo de su absorción (Saura-Calixto y col., 2007). Por otro lado, la fracción insoluble se consideró “no bioaccesible”, y podría presentar efecto

antioxidante durante su tránsito en el intestino grueso (Perales y col., 2008; Del Pino-García y col., 2016).

Mediante los ensayos de FRAP y DPPH se encontró que la cocción generaba un aumento significativo en el contenido de antioxidantes presentes en la fracción digerida soluble de las galletitas ($P \leq 0,05$). Este contenido de antioxidantes aumentaba significativamente con el tiempo y la temperatura de cocción ($P \leq 0,05$) (Figura 3.24).

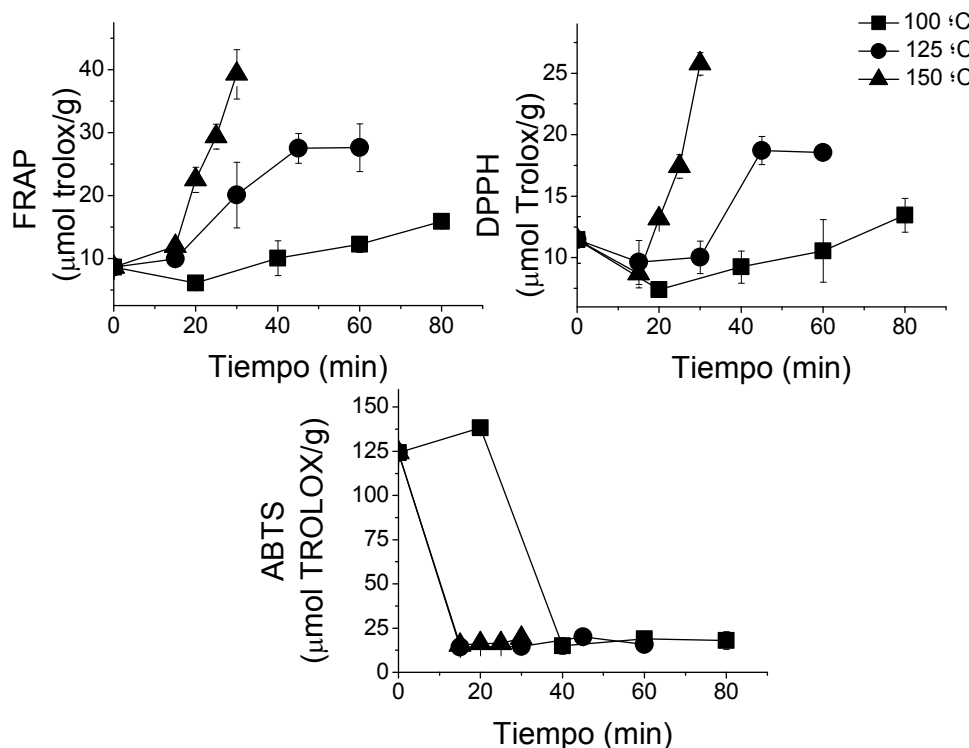


Figura 3.24. Antioxidantes determinados por la técnica de FRAP, DPPH y ABTS presentes en la fracción digerida soluble de galletitas preparadas bajo distintas condiciones de cocción. Las barras verticales indican la desviación estándar.

El análisis estadístico mostró que en las galletitas horneadas a 100 °C la actividad antioxidante medida por DPPH y FRAP aumentó significativamente luego de los 80 min de cocción. Por otro lado, la cocción a 125 °C incrementó significativamente el contenido de antioxidantes cuantificado por la técnica de FRAP a los 30 min, mientras que la técnica de DPPH detectó un aumento significativo a los 40 min. Finalmente la cocción a 150 °C presentó un contenido superior de antioxidantes que la cocción a menores temperaturas: el contenido de antioxidantes cuantificado por DPPH mostró un significativo aumento a los 25 min de cocción, mientras que el ensayo de FRAP indicó un significativo aumento a los 20 min. Es probable que

estas pequeñas diferencias en las técnicas utilizadas se deban principalmente a los distintos fundamentos en los que se basan las mismas.

El ensayo de DPPH permite cuantificar el contenido de compuestos con capacidad de donar hidrógenos en un medio etanólico formando una molécula estable de DPPH-H a partir del radical libre DPPH[•]. Vhangani y Van Wyk (2013) también encontraron que la actividad antioxidante de sistemas modelo preparados a partir de fructosa-lisina y ribosa-lisina tratadas a alta temperatura (121 °C) aumentaba con el tiempo del tratamiento térmico. Estos autores apoyaron la idea que la capacidad antioxidante determinada mediante la técnica de DPPH se debía a la capacidad de los compuestos de Maillard de donar hidrógenos para formar una molécula estable DPPH-H.

El contenido de antioxidantes cuantificado mediante el ensayo de DPPH mostró una excelente correlación con el ensayo de FRAP. En el ensayo de FRAP el Fe (III) es reducido a Fe(II) por acción de los compuestos dadores de electrones en un medio ácido. Kim y Lee (2009) analizaron la generación de compuestos de Maillard en sistemas modelo glucosa/glicina diglicina y triglicina (di y tri péptidos de glicina). Esos autores también encontraron que la actividad antioxidante determinada por DPPH se correspondía con la determinada con el ensayo de FRAP, a pesar de que los mecanismos de las técnicas son distintos. Estos resultados indican entonces que los compuestos de Maillard actuarían como donores tanto de electrones como de hidrógeno.

El ensayo de ABTS, en cambio, mostró una tendencia muy diferente a la observada con los ensayos de DPPH y FRAP. Esta técnica mostró una alta capacidad antioxidante en las masas, muy superior a la de las galletitas obtenidas después del horneado ($P \leq 0,05$). Esto indicaría que el ensayo de ABTS es poco sensible a los antioxidantes generados vía reacción de Maillard en galletitas. Los resultados de Campos-Vega y col. (2015) mostraron la misma tendencia; estos autores encontraron que durante el proceso de tostado del café, la actividad antioxidante del producto, determinada mediante la técnica de ABTS, disminuía, mientras que el ensayo de DPPH mostraba la tendencia opuesta (generación de antioxidantes durante el calentamiento). La actividad antioxidante de las masas puede deberse a los ingredientes utilizados en la formulación. En la harina de trigo blanca se han encontrado compuestos fenólicos en cantidades considerables, aunque significativamente menores a las encontradas en harinas integrales (Gélinas y McKinnon, 2006). Por otro lado, la leche en polvo descremada puede contener antioxidantes como péptidos cortos, proteínas (como la caseína) y, en cierta medida, los compuestos de reacción de Maillard generados durante su procesamiento o durante su tiempo de conservación (Zulueta y col., 2009; Gonzales y col., 2010). Estos resultados confirman la necesidad de utilizar más de una técnica para evaluar la actividad antioxidante.

En resumen, al comparar los resultados de los tres ensayos de antioxidantes (DPPH, FAP y ABTS) se puede ver que, si bien el ensayo de ABTS muestra una gran actividad antioxidante en las masas que se pierde con el tratamiento térmico, esta pérdida es compensada por la generación de compuestos de Maillard (cuantificada mediante los ensayos de FRAP y DPPH). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rufián-Henares y Delgado-Andrade (2009^b), quienes evaluaron el efecto del tratamiento térmico sobre cereales. De acuerdo con estos autores, el tratamiento térmico destruye compuestos polifenólicos y vitaminas con poder antioxidante, pero la pérdida es compensada por la generación de los compuestos de derivados del pardeamiento no enzimático.

A pesar del alto consumo de los compuestos de Maillard en la dieta, poco se sabe acerca de su absorción y tránsito en el aparato digestivo (Somoza, 2005). Según diversos autores, los productos de Maillard de bajo peso molecular, así como los que resultan del metabolismo intestinal, se pueden absorber hasta en un 30 % (Roncero-Ramos, 2013). Los estudios realizados sobre animales de laboratorio alimentados con compuestos de Maillard marcados radiactivamente mostraron que la absorción de los mismos ocurriría el intestino delgado, mientras que la fracción que no absorbida podría ser metabolizada por las bacterias presentes en el intestino grueso y liberada al medio ejerciendo su acción *in situ* (Faist y Erbersdobler, 2001; Somoza, 2005). Considerando esto se evaluó la liberación de los compuestos de Maillard en galletitas luego de un proceso de fermentación (Figura 3.25).

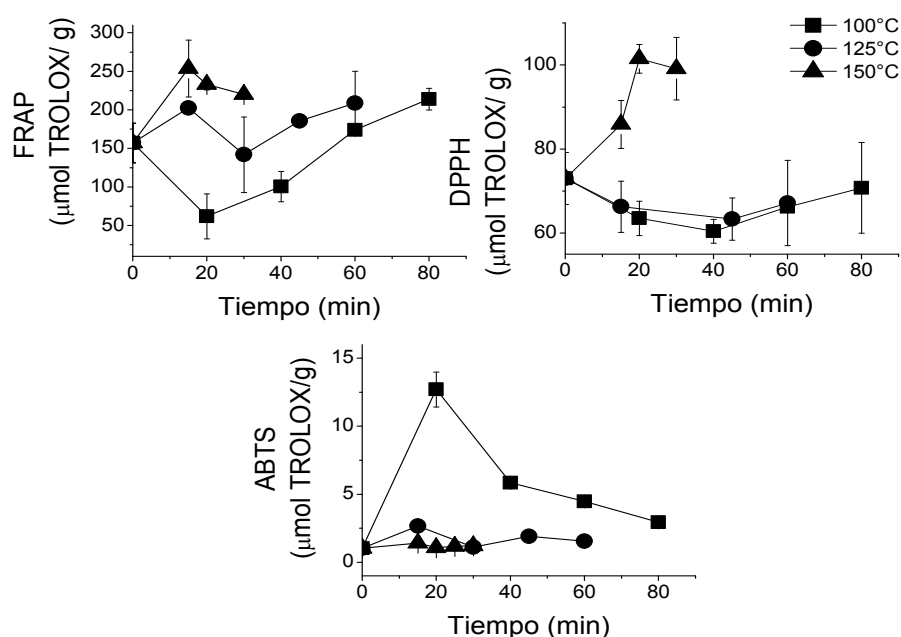


Figura 3.25. Antioxidantes determinados por las técnicas de FRAP, DPPH y ABTS presentes en la fracción soluble después de fermentar galletitas preparadas bajo distintas condiciones de cocción. Las barras verticales indican la desviación estándar.

Los resultados confirmaron que gran parte de los compuestos de Maillard con capacidad antioxidante se liberan durante la fermentación por las bacterias colónicas. Como se mencionó previamente, las referencias bibliográficas muestran que sería improbable que ocurra absorción de los compuestos de Maillard a través del epitelio del intestino grueso, ya que la mayor parte de la absorción de las melanoidinas se daría a nivel del intestino delgado (Faist y Erbersdobler, 2001). Los antioxidantes liberados durante la fermentación, ejercerían entonces su efecto durante su pasaje por el tracto intestinal: generarían un ambiente antioxidante que permitiría la neutralización de los radicales libres y contrarrestarían los efectos de los compuestos pro-oxidantes presentes en la dieta (Saura-Calixto, 2011).

Nuevamente se pudo comprobar mediante los ensayos de DPPH y FRAP que el tratamiento térmico influye fuertemente en el contenido de antioxidantes recuperados luego de la fermentación, siendo mayor en las galletitas horneadas a mayor temperatura (150 °C) ($P \leq 0,05$).

Al comparar la capacidad antioxidante de las dos fracciones bioaccesibles obtenidas, se puede ver que el proceso de fermentación libera una gran cantidad de antioxidantes, muy superior a la liberada durante el proceso digestivo. Del Pino-García y col (2016) determinaron la capacidad antioxidante sobre las fracciones bioaccesibles luego de la digestión y la fermentación colónica de distintos aderezos en polvo derivados del orujo del vino tinto. Estos autores también observaron un importante incremento en el poder antioxidante luego de la fermentación, y pudieron concluir que los antioxidantes liberados por acción de las bacterias intestinales eran los principales responsables de la actividad antioxidante de los aderezos analizados. Los resultados de Campos-Vega y col. (2015) también demostraron que el mayor aporte de antioxidantes de los pozos de café (ricos en compuestos de Maillard) se obtenía luego de la fermentación colónica. Del mismo modo, Saura Calixto y col. (2007) encontraron una importante cantidad de compuestos fenólicos liberados durante la fermentación colónica de distintas muestras alimenticias (frutas, cereales, vegetales y legumbres). Estos autores indicaron que aproximadamente el 95 % de los taninos presentes en las muestras eran liberados de la matriz por acción de las bacterias intestinales.

Finalmente se determinó el contenido de antioxidantes en los insolubles luego de la fermentación, en las muestras de masa y los productos finales obtenidos a cada temperatura: galletitas horneadas a 100 °C por 80 min, a 125 °C por 60 min y a 150 °C por 30 min. Los resultados se pueden ver en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Contenido de antioxidantes insolubles en masas y en galletitas: 100/80: horneadas a 100°C durante 80 min; 125/60: horneadas a 125°C durante 60 min; 150/30: horneadas a 150°C durante 30 min.

	FRAP Insolubles ($\mu\text{mol TROLOX/g}$)	DPPH Insolubles ($\mu\text{mol TROLOX/g}$)
Masas	$28,6 \pm 0,3^a$	$0,191 \pm 0,001^d$
100/80	$38,0 \pm 8,0^a$	$0,111 \pm 0,002^b$
125/60	$45,7 \pm 5,8^{ab}$	$0,153 \pm 0,001^c$
150/30	$58,0 \pm 9,2^b$	$0,081 \pm 0,002^a$

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. Supraíndices iguales en la misma columna indican que no hay diferencias significativas entre las medias ($P > 0,05$).

El contenido de antioxidantes remanente fue mínimo al compararlo con el contenido de antioxidantes solubles totales cuantificados. Los valores de la capacidad antioxidante de la fracción bioaccesible muestran que la mayor parte de los antioxidantes serían liberados tras el proceso de digestión/fermentación, y podrían presentar efectos beneficiosos sobre la salud. El ensayo de FRAP de las fracciones insolubles mostró que el contenido de antioxidantes remanentes aumentó con la severidad del tratamiento térmico ($P \leq 0,05$). Los resultados del ensayo de DPPH, en cambio, mostraron una tendencia completamente contraria; sin embargo, sus valores fueron extremadamente bajos.

Por otro lado estos resultados indicarían que la extracción utilizada (digestión enzimática + fermentación colónica) permitió la liberación de la mayor parte de los antioxidantes presentes en la muestra. Trabajos realizados por Pastoriza de la Cueva y col. (2011) y por Delgado-Andrade y col. (2010^c) mostraron mayores aportes de la fracción insoluble al poder antioxidante total en productos panificados. Sin embargo, en estos trabajos no se realizó una fermentación del residuo insoluble obtenido luego de la digestión enzimática. Nuestros resultados muestran la importancia de incorporar este paso en el análisis de alimentos que contengan compuestos antioxidantes derivados de la reacción de Maillard.

3.4.2.3 Capacidad antioxidante y color en galletitas

Se evaluó la correlación entre la capacidad antioxidante cuantificada mediante las distintas técnicas, y entre el contenido de antioxidantes y el color de las galletitas mediante el coeficiente de correlación de Pearson (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante medida con distintos métodos y los parámetros de color

	FRAP _D	DPPH _D	ABTS _D	FRAP _F	DPPH _F	ABTS _F	L*	ΔE	BI
FRAP _D	1								
DPPH _D	0,91*	1							
ABTS _D	-0,47	-0,31	1						
FRAP _F	0,38	0,38	-0,54	1					
DPPH _F	0,36	0,44	-0,07	0,6	1				
ABTS _F	-0,52	-0,46	0,57	-0,71	-0,29	1			
L*	-0,96*	-0,85*	0,52	-0,39	-0,4	0,52	1		
ΔE	0,94*	0,8*	-0,6	0,37	0,28	-0,51	-0,98*	1	
BI	0,8*	0,63	-0,57	0,33	0,06	-0,5	-0,84*	0,91*	1
YI	0,66	0,46	-0,67	0,34	-0,06	-0,49	-0,7	0,82*	0,96*

* Correlaciones significativas ($P \leq 0,05$) y $r \geq 0,8$

D: Antioxidantes bioaccesibles luego de la digestión

F: Antioxidantes bioaccesibles luego de la fermentación

El coeficiente de correlación de Pearson (Tabla 3.5) es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables, asume valores en el intervalo [-1;1]: valores de -1 indican una correlación negativa perfecta, mientras que valores de 1 indican una correlación positiva perfecta; valores de 0 indican que no hay relación. En otras palabras, el signo indica el sentido de la correlación y el valor absoluto mide la fuerza de la correlación (Balzarini y col., 2008). Delgado Andrade y col. (2005^b) analizaron las correlaciones entre los ensayos de antioxidantes en melanoidinas de café. Estos autores encontraron fuertes correlaciones entre los ensayos de FRAP y DPPH, a pesar que estos métodos involucran distintos mecanismos antioxidantes. Esta tendencia se repitió en nuestros ensayos, en las fracciones bioaccesibles luego de la digestión de las galletitas (Tabla 3.5). Sin embargo esta correlación no se observó al cuantificar la actividad antioxidante de las fracciones solubles luego de la fermentación.

El color es el atributo externo más relevante que se puede relacionar con la generación de productos de Maillard. Se evaluó la relación entre la actividad antioxidante obtenida mediante las distintas técnicas y los distintos parámetros de color recomendados en la bibliografía para el seguimiento del pardeamiento no enzimático (L*, BI, ΔE y YI). Se encontraron excelentes correlaciones entre los parámetros L* y ΔE con los ensayos de antioxidantes bioaccesibles luego de la digestión, cuantificados mediante las técnicas de FRAP y DPPH (Tabla 3.5). Es esperable que estos dos parámetros de color se comporten de manera similar, ya que como se explicó previamente, el parámetro ΔE está principalmente influenciado por el L* (Morales y van Boekel, 1998). Las correlaciones más bajas se encontraron para el

parámetros YI con el contenido de antioxidantes (en todos los casos $r < 0,7$, Tabla 3.5). Se podría concluir entonces que el parámetro de color que mejor se relaciona con la generación de antioxidantes bioaccesibles luego de la digestión en galletitas es el parámetro L^* , que disminuye al generarse compuestos de pardeamiento no enzimático.

3.4.3 Efecto de los compuestos de Maillard *in vivo*

Para analizar el efecto que tiene el consumo de los productos de Maillard generados en galletitas se realizó un ensayo con animales de laboratorio (ratas Wistar machos). Se les suministró como parte de la dieta galletitas preparadas bajo distintas condiciones de cocción: baja temperatura (100 °C por 80 min, dieta GBT) y alta temperatura (150 °C por 30 min, dieta GAT).

Se utilizaron 4 grupos de ratas de 6 animales cada uno a los que se les administraron las siguientes dietas (sección 3.3.4.4):

- Grupo control (grupo G-CO): dieta control AIN + agua destilada
- Grupo ácido ascórbico (grupo G-ASC): dieta control + agua destilada con ácido ascórbico como antioxidante
- Grupo galletita alta temperatura (grupo G-GAT): dieta parcialmente reemplazada con galletitas con un alto contenido de compuestos de Maillard + agua destilada
- Grupo galletitas baja temperatura (grupo G-GBT): dieta control parcialmente reemplazada con galletitas con un bajo contenido mínimo de compuestos de Maillard + agua destilada

3.4.3.1 Composición de las galletitas y caracterización de las melanoidinas

La composición final de las galletitas se determinó con métodos estandarizados de análisis. Las formulaciones contenían 77,8 g de carbohidratos sin considerar fibra (14,4 % provenientes de la lactosa de la leche; 67,6 % del almidón de la harina, el polvo de hornear y el almidón de maíz, y el 18,0 % restante provenía de la sacarosa utilizada); 11,5 g de proteínas (70 % proteínas de la leche en polvo descremada y 30 % proteínas de la harina); 8,2 g de lípidos (principalmente del aceite de girasol alto oleico); 2,3 g de fibra dietaria y 0,2 g de cenizas por cada 100 g de galletitas en base seca. Tanto en las galletitas horneadas a baja temperatura como en las horneadas a alta temperatura el contenido de humedad fue menor al 10 % (el CAA en su cap. IX, art. 747 establece un límite máximo de 12 % de humedad para galletitas) (CAA, 2014^a).

Para corroborar la presencia de compuestos de Maillard en las galletitas incorporadas a las dietas, los mismos fueron aislados y se realizaron análisis de caracterización (espectro de absorbancia UV/VIS). En productos como las galletas o el pan, el tratamiento térmico da lugar a la formación de estructuras complejas de melanoidinas, conocidas como melanoproteínas. Estas estructuras son el resultado del entrecruzamiento de las proteínas en los productos panificados y generan una red de alto peso molecular e insoluble (Pastoriza de la Cueva y

Rufián Henares, 2014). Para liberar a las melanoidinas de esta estructura se realizó una hidrólisis con pronasa E (una proteasa ampliamente utilizada para este propósito, ya que es la más adecuada para solubilizar el gluten (Borrelli y col., 2003; Roncero-Ramos y col., 2012). Una vez finalizada la hidrólisis, las melanoidinas de alto peso molecular deben ser aisladas mediante un proceso de ultrafiltración seguido de liofilización; sin embargo, por la complejidad de las reacciones de Maillard, no existe un método estandarizado para su aislamiento. En productos alimenticios se han utilizado distintos métodos para su purificación, que incluyen membranas con tamaño de corte entre 5 (Pastoriza de la Cueva y Rufián Henares, 2014) y 10 KDa (Borrelli y col., 2003). En el presente trabajo se seleccionó un tamaño de corte de 5 KDa por haber demostrado tener buenos resultados en la extracción de melanoidinas en cereales de desayuno, galletas y corteza de pan (Roncero-Ramos y col., 2012; Pastoriza de la Cueva y Rufián Henares, 2014).

Los compuestos de alto peso molecular (> 5 KDa) retenidos fueron solubilizados y se analizó su espectro de absorción UV/VIS (400-750 nm). La absorbancia a 294 nm se relaciona habitualmente con la presencia de compuestos intermedios de la reacción de Maillard, mientras que la presencia de compuestos finales es monitoreada mediante la medida de la absorbancia a 420 nm (Vhangani y Van Wyk, 2013). En la Figura 3.26 se pueden observar los espectros de absorción encontrados para las melanoidinas aisladas de las galletitas horneadas a baja temperatura (100°C por 80 min, utilizada para preparar la dieta GBT) y a alta temperatura (horneada 150°C por 30 min, esta galletita fue utilizada para la dieta GAT).

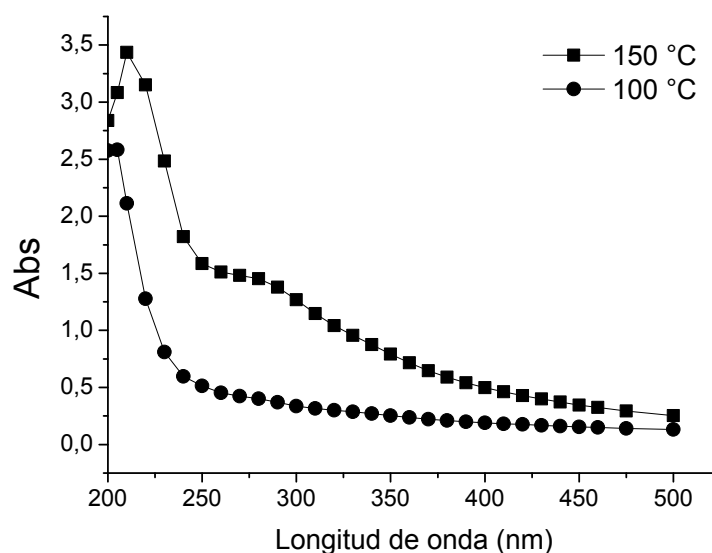


Figura 3.26. Espectro de absorción promedio de dos determinaciones de melanoidinas aisladas en galletitas horneadas a 150°C por 30 min y a 100°C por 80 min.

Se puede ver que las galletitas horneadas a 150°C presentan un contenido mayor de compuestos secundarios y finales de la reacción de Maillard que las galletitas horneadas a 100°C (la absorbancia a 420 nm de las melanoidinas presentes en las galletitas horneadas a alta temperatura resultó significativamente superior, $P < 0,05$, a la de las melanoidinas horneadas a baja temperatura: $0,411 \pm 0,02$ y $0,160 \pm 0,02$ respectivamente). En ambos casos se puede observar una importante absorción en el UV lejano (230 nm) que probablemente corresponda al enlace peptídico, remanente de la hidrólisis de las proteínas (Devlin, 2004). Pastoriza de la Cueva y Rufián Henares (2014) aislaron melanoidinas de galletitas, de forma similar a la utilizada en las galletitas desarrolladas en el presente trabajo. Estos autores encontraron que las melanoidinas presentaban aproximadamente un 50 % de estructura proteica y un 40 % de carbohidratos.

Es interesante destacar que en las melanoidinas de las galletitas no se obtiene una señal nítida de absorbancia a 420 nm. Probablemente porque, en la compleja red que se forma durante la cocción, las melanoidinas (compuestos finales de la reacción de Maillard) conserven también parte de los compuestos secundarios. En concordancia con estos resultados, el trabajo de Rufián-Henares y col. (2009) considera que las melanoidinas presentan máximos de absorbancia tanto a 290 como a 420 nm. En las referencias bibliográficas se pueden encontrar algunos espectros con señales bien diferenciadas obtenidas de melanoidinas desarrolladas en sistemas modelo (Yu y col., 2012; Echavarría y col., 2016); sin embargo, en sistemas reales como las galletitas, el pan o el café los espectros se vuelven más complejos y los picos menos definidos (Fogliano y col., 1999; Bekedam y col., 2006). No obstante, al igual que en las melanoidinas aisladas en las galletitas del presente trabajo, todas las referencias bibliográficas coinciden en que la absorbancia a 294 es superior a la obtenida a 420 nm (Yu y col., 2012; Pastoriza de la Cueva y Rufián Henares, 2014). Esto demuestra los compuestos aislados tienen una mayor absorción en la región UV que en la región visible, característica ya observada por Pastoriza de la Cueva y Rufián Henares (2014).

Estos resultados confirman lo observado en los ensayos de antioxidantes. Se pudo concluir que la dieta GAT, en la que se incorporaron las galletitas horneadas a alta temperatura (150 °C), contenía mayores cantidades de productos de reacción de Maillard (tantos finales como secundarios, ya que estos últimos forman parte de la estructura de los primeros), mientras que la dieta GBT preparada con galletitas horneadas a baja temperatura (100 °C) tenía un contenido bajo de compuestos de Maillard. La dieta GBT podía ser utilizada entonces para descartar un posible efecto de los ingredientes de las galletitas.

3.4.3.2 Peso de los animales, consumo de alimento y eficiencia alimentaria

Tal como se puede ver en la Figura 3.27 los animales aumentaron de peso hasta alcanzar su peso final en las últimas dos semanas de ensayo.

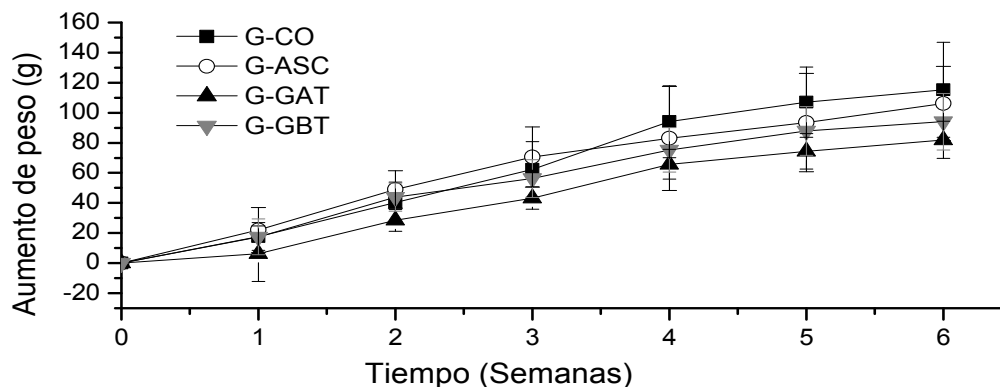


Figura 3.27. Aumento de peso de ratas que consumieron distintas dietas experimentales durante 6 semanas (grupos G-CO, G-ASC, G-GAT, G-GBT). Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

Durante la experiencia se encontraron diferencias significativas en el incremento de peso de los animales, siendo el grupo alimentado con la dieta GAT el que aumentó menos de peso a lo largo de la experiencia. Finalizadas las 6 semanas de ensayo las ratas de este grupo obtuvieron un peso corporal ($383,1 \pm 14,1$ g) significativamente menor ($P \leq 0,05$) al de los otros grupos ($407,6 \pm 19,0$; $410,6 \pm 12,7$ y $427,4 \pm 17,3$ g para los grupos G-CO, G-ASC y G-GBT, respectivamente). Entre las semanas 5 y 6 no se observaron diferencias significativas en el peso de los animales ($P > 0,05$).

Delgado Andrade y col. (2013^b) estudiaron el aumento de peso en ratas alimentadas con compuestos de Maillard de alto peso molecular obtenidos a partir de la corteza del pan. Sus estudios indicaron que aquellos animales que habían consumido una dieta rica en estos productos presentaban un menor peso que los animales que consumían la dieta control. En estos estudios los autores sugirieron que la diferencia se debía a que los animales consumían una mayor cantidad de la dieta control que la dieta rica en compuestos de Maillard. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que, a pesar de que las ratas alimentadas con la dieta control presentaban un mayor consumo de alimento que las alimentadas con las dietas GAT y GBT (datos no mostrados, $P \leq 0,05$), no se encontró una buena correlación entre el consumo de dieta y el aumento de peso ($r = 0,14$).

Por otro lado, sí se encontró una excelente correlación entre la eficiencia alimentaria y el aumento de peso ($r= 0,98$). Tal como se puede ver en la Figura 3.28, el grupo G-GAT presentó la menor eficiencia alimentaria ($P \leq 0,05$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los otros grupos ($P > 0,05$).

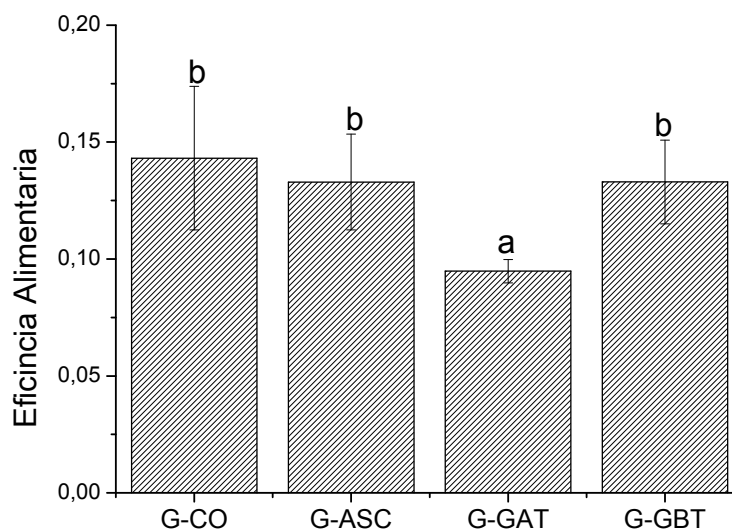


Figura 3.28. Eficiencia alimentaria en animales que consumieron las distintas dietas experimentales durante 6 semanas (grupo G-CO; G-ASC; G-GAT, G-GBT). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en sus medias ($P > 0,05$). Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

Esto podría explicarse considerando que durante la reacción de Maillard la calidad de las proteínas disminuye por la condensación de los grupos ε -amino de la lisina con el grupo carbonilo de los carbohidratos. Este proceso puede disminuir la cantidad de lisina disponible (un aminoácido esencial). Además, durante un tratamiento térmico más pronunciado, el entrecruzamiento entre proteínas generaría una mayor proporción de proteína insoluble y menos susceptible a la acción de las enzimas del tracto gastrointestinal, por lo que la digestión de las proteínas disminuye (Oste y Sjödin, 1984). Podría inferirse entonces que la mayor temperatura utilizada durante la cocción de las galletitas horneadas a 150 °C disminuye la eficiencia alimentaria de las dietas al disminuir la lisina disponible y la digestibilidad de las proteínas, generando una reducción significativa en el peso de los animales.

3.4.3.3 Actividad antioxidante y oxidación lipídica en suero

El ácido ascórbico es un conocido antioxidante soluble en agua, y su capacidad de prevenir el daño oxidativo en ensayos *in vivo* ya ha sido demostrada (Sönmez y col., 2005). Por esto se utilizó al grupo G-ASC como un control positivo de antioxidantes. Tal como se comprobó

anteriormente, el poder antioxidante liberado durante el proceso de digestión de las galletitas horneadas a mayor temperatura resultó superior al de las galletitas horneadas a bajas temperaturas (sección 3.4.2.2, Figura 3.24) Los animales del grupo G-GAT consumieron entonces una dieta rica en antioxidantes con poder de captar radicales libres (como radical hidroxilo, superóxido y peróxido) que podrían ser absorbidos en el intestino delgado (Langner y Rzeski, 2014).

El poder antioxidante en suero se determinó con las dos técnicas más utilizadas para este tipo de muestra biológica: FRAP y ABTS. El nivel de oxidación lipídica y el contenido de antioxidantes en suero se pueden observar en la Figura 3.29. Como era esperado, el contenido de antioxidantes medido mediante el ensayo de FRAP en el suero de las ratas pertenecientes al grupo G-GAT y G-ASC fue significativamente superior al del resto de los grupos. Por otro lado, el contenido de antioxidantes evaluado con la técnica de ABTS siguió la misma tendencia, aunque se observaron algunas mínimas diferencias: el contenido de antioxidantes en el suero de los animales pertenecientes al grupo control (G-CO) y el grupo G-ASC no se diferenciaron significativamente ($P > 0,05$). Sin embargo, los animales del grupo G-GAT sí presentaron una actividad antioxidante en el suero superior al grupo G-CO ($P \leq 0,05$). Esto indicaría que al menos una parte de los productos de Maillard liberados durante el proceso de digestión pudo ser absorbida en el intestino delgado. De igual manera, Anton y col. (2012) encontraron un mayor contenido de compuestos fluorescentes (característicos de los compuestos de Maillard) en el suero de ratones que habían consumido dietas tratadas térmicamente, ricas en compuestos derivados del pardeamiento no enzimático.

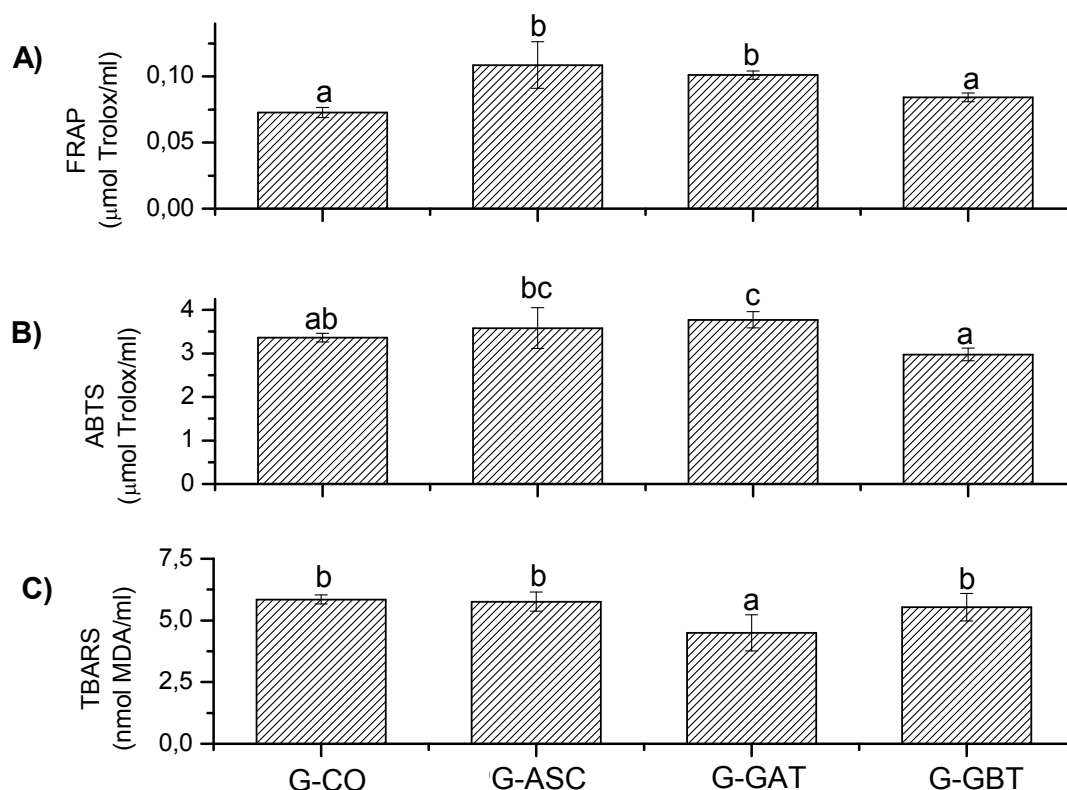


Figura 3.29. Efecto del consumo de distintas dietas (grupos G-CO, G-ASC; G-GAT, G-GBT). en el contenido de antioxidantes del suero medido por (A) FRAP (B) ABTS, y nivel de peroxidación lipídica (C) MDA: malonaldehído. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en sus medias ($P > 0,05$). Las barras verticales indican las desviaciones estándar

El contenido de compuestos derivados de la oxidación lipídica se determinó mediante la medida de sustancias reactivas al TBA (TBARS). Los resultados obtenidos mediante este ensayo fueron similares a los informados por otros autores: si bien el valor del TBARS del grupo control fue levemente superior al obtenido por da Silva y col. (2013), se correspondió correctamente al obtenido por Lado y col. (2015) (en todos estos trabajos se trabajó con ratas Wistar, alimentadas con dieta AIN).

Los resultados encontrados en el presente trabajo mostraron que el grupo de animales que había consumido la dieta GAT presentaba un menor nivel de peroxidación lipídica ($P \leq 0,05$) en comparación con el resto de los grupos, inferior incluso que el grupo G-ASC. Esto sugiere que los compuestos de Maillard derivados de las galletitas serían más efectivos en la protección contra la oxidación lipídica que el ácido ascórbico en las condiciones del ensayo, aunque en el contenido de antioxidantes en suero no se observaron diferencias significativas.

Al comparar los resultados del poder antioxidante en suero con el contenido de antioxidantes bioaccesibles luego de la digestión de galletitas horneadas a 100 °C por 80 min, y

a 150°C por 30 min (Figura 3.24), se puede ver que estas últimas presentaban un poder antioxidante que prácticamente duplicaba al de las primeras. Sin embargo, esta diferencia no parece ser tan obvia en el contenido de antioxidantes del suero de los animales que consumieron dietas parcialmente reemplazadas con estas galletitas. Las diferencias entre los ensayos *in vivo* e *in vitro* probablemente se deban a la absorción que pueden tener los compuestos de Maillard en el tracto digestivo. Si bien actualmente no se conoce bien el proceso de metabolización y absorción de las melanoidinas, es aceptado que las melanoidinas son principalmente recuperadas en la materia fecal. De acuerdo con Wang y col. (2011) sólo un 30 % de las melanoidinas de bajo peso molecular (<10 kDa) pueden ser absorbidas y transportadas al torrente sanguíneo. Por otro lado, las melanoidinas de alto peso molecular son menos absorbidas que las de bajo peso molecular, y podrían generar sólo un efecto antioxidante limitado *in vivo*. Serían necesarios más ensayos para analizar el proceso de metabolización de los compuestos de Maillard absorbidos, ya que la capacidad antioxidante cuantificada puede deberse a distintos compuestos.

Los antioxidantes no absorbidos y los liberados durante el proceso de fermentación que no puedan ser absorbidos a través del intestino grueso tendrían acción *in situ* generando un ambiente antioxidante en el tracto intestinal (Saura Calixto, 2011).

3.4.3.4 Microbiota fecal

El efecto benéfico de las bacterias ácido lácticas ha atraído fuertemente la atención durante los últimos años. El interés particular en este tipo de bacterias se debe a que promoverían cambios favorables en el tracto gastrointestinal: reducirían la severidad y frecuencia de diarreas y podrían disminuir el riesgo de cáncer de colon, entre otros beneficios (Masood y col., 2011).

Los prebióticos son compuestos de la dieta que, al no ser digeridos en el intestino delgado, pueden continuar su recorrido por el tracto digestivo, y al llegar al intestino grueso ser utilizados por bacterias benéficas como las bacterias lácticas promoviendo su crecimiento (Jiménez-Escrig y col., 2013).

A pesar de que se sabe que una parte de las melanoidinas no puede ser digerida, es poco lo que se ha estudiado acerca de su potencial efecto prebiótico (Borrelli y col., 2005; Wang y col., 2011).

Para evaluar el efecto prebiótico de los compuestos de Maillard presentes en las galletitas se realizó un recuento de bacterias mesófilas totales y de bacterias lácticas al inicio y al final del ensayo *in vivo*, utilizando distintos medios de cultivo. Sobre las colonias obtenidas en agar MRS en condiciones de anaerobiosis se realizó una tinción de Gram y se evaluó la

actividad de la enzima catalasa. Las colonias aisladas resultaron ser catalasa negativa y Gram positivas, características distintivas de las bacterias lácticas. A modo de ejemplo se muestran fotografías obtenidas luego de la tinción de los dos tipos de colonias obtenidas en el agar MRS (Figura 3.30).

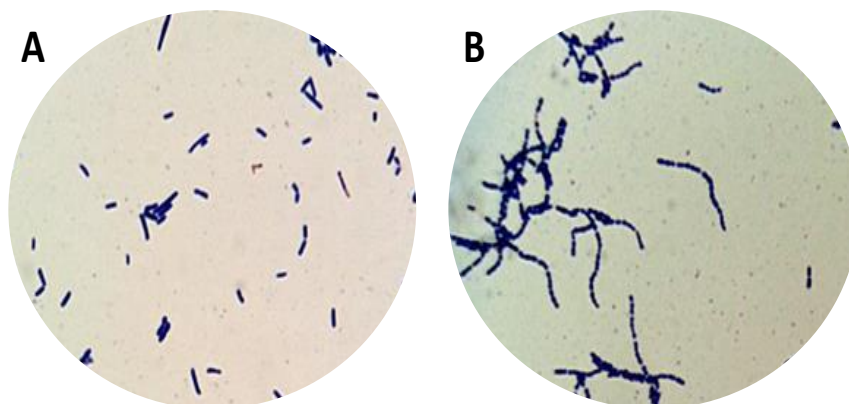


Figura 3.30. Microscopía de las colonias aisladas en el agar MRS. Se encontraron bacterias con características de bacilos (A) y cocos (B) (Aumento 400X)

No se encontraron diferencias significativas en los recuentos realizados sobre los distintos grupos al inicio del ensayo (el log UFC fue de 9,0 y 8,3 por g de materia fecal seca para bacterias lácticas y totales, respectivamente).

Sin embargo, al final de la experiencia se encontró que los animales que habían consumido la dieta GAT (grupo G-GAT) presentaron un recuento de bacterias lácticas significativamente superior a los animales del grupo G-GBT y G-CO ($P \leq 0,05$). Los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Microbiota fecal en ratas alimentadas con distintas dietas (grupo G-CO, G-GAT, G-GBT) al finalizar la experiencia.

	Grupo G-Co	Grupo G-GAT	Grupo G-GBT
Bacterias lácticas (log UFC/ g material fecal seca)	8,83 ± 0,15 ^a	9,32 ± 0,06 ^b	8,74 ± 0,33 ^a
Bacterias mesófilas (log UFC/ g material fecal seca)	8,27 ± 0,95 ^a	7,66 ± 0,52 ^a	8,25 ± 0,25 ^a
Relación bacterias Lácticas/mesófilas	1,07 ± 0,09 ^a	1,21 ± 0,08 ^b	1,06 ± 0,04 ^a

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. Supraíndices iguales en la misma fila indican que no hay diferencias significativas entre las medias ($P > 0,05$)

Por otro lado, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en el recuento de bacterias mesófilas totales al final de la experiencia para los distintos grupos ($P > 0,05$), la relación bacterias lácticas/bacterias mesófilas totales resultó ser significativamente superior en

los animales del grupo G-GAT ($P \leq 0,05$). Esto sugiere una predominancia de bacterias lácticas en los animales que habían consumido dieta GAT; una alta proporción de estas bacterias podrían modificar favorablemente el ambiente intestinal y en última instancia conducir a una menor incidencia en el cáncer colorrectal (Vargo y col., 1980). También podría disminuir la incidencia de diarreas, tal como lo demostraron Anton y col. (2012) sobre ratones alimentados con una dieta rica en productos de Maillard.

Los resultados obtenidos sugieren que el consumo de una dieta rica en melanoidinas de galletitas durante 6 semanas podría modificar favorablemente la composición de las bacterias colónicas en animales sanos. Esto podría deberse a que parte de las melanoidinas producidas por la cocción a alta temperatura no pueden ser digeridas, y llegan al intestino grueso donde selectivamente incrementan el contenido de bacterias benéficas como las bacterias lácticas. Existen distintas hipótesis que podrían explicar este resultado. Por un lado, los resultados de Borrelli y Fogliano (2005) mostraron que las bifidobacterias podrían utilizar a las melanoidinas de la corteza del pan como fuente de carbono y nitrógeno de una manera más eficiente que otras bacterias (*Clostridium*, *Bacteroides spp.*, *Streptococci* y *Enterobacteriaceae*). Una vez liberadas, las melanoidinas podrían ejercer su actividad antimicrobiana ya demostrada sobre distintas cepas patogénicas. Rufián-Henares y col. (2009) demostraron que las melanoidinas del café inhiben el crecimiento de bacterias como *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Además, es posible que la presencia de antioxidantes presentes en la dieta G-AT pueda haber ejercido cierta influencia sobre los recuentos de bacterias colónicas. En bibliografía se encontró que el consumo compuestos antioxidantes (como el resveratrol, las antocianinas o los compuestos fenólicos) favorecerían el crecimiento de Bifidobacterias y Lactobacilos, a la vez que inhibirían el crecimiento de bacterias patogénicas como *Staphylococcus spp*, *Salmonella spp*, *Helicobacter pylori* y *Bacillus cereus* (Laparra y Sanz, 2010; Saura-Calixto, 2011).

3.4.3.5 Humedad de materia fecal y absorción aparente de minerales

El contenido de humedad de la materia fecal de los grupos G-GAT, G-GBT y G-CO al finalizar el ensayo se puede ver en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Humedad en materia fecal y absorción aparente de minerales en ratas alimentadas con distintas dietas (grupos G-CO, G-GAT, G-GBT) al finaliza el ensayo.

	Grupo G-Co	Grupo G-GAT	Grupo G-GBT
Humedad de material fecal (%)	52,8 ± 1,8 ^a	65,3 ± 1,9 ^b	57,4 ± 2,0 ^a
Absorción mineral aparente (%)	61,7 ± 8,5 ^b	51,9 ± 4,6 ^b	29,9 ± 5,9 ^a

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila indican que los promedios no se diferencian significativamente ($P \leq 0,05$).

Se observa que el consumo de una dieta rica en melanoidinas incrementó el contenido de humedad de las heces de los animales del G-GAT ($P \leq 0,05$). Estudios previos han documentado la capacidad que tiene la fibra dietaria de incrementar el contenido de humedad de la materia fecal por su capacidad de retener agua (Eastwood, 1992). Por otro lado, en buena concordancia con este hecho, Pérez-Jiménez y col. (2014) evaluaron la contribución de los compuestos de Maillard a la fibra dietaria en un estudio *in vitro*. Sus resultados indicaron que un mayor desarrollo de la reacción de Maillard podría incrementar el contenido de fibra dietaria en productos panificados, aunque su estructura sea diferente a los compuestos habitualmente considerados como fibra (polisacáridos distintos al almidón, lignina, almidón resistente, etc). Estos resultados, sumados al hecho que los compuestos de Maillard modularían favorablemente la presencia de bacterias lácticas en el colon y presentan una importante capacidad antioxidante, apoyarían la teoría de que los compuestos de Maillard podrían actuar como “fibra dietaria antioxidante” (concepto postulado por Saura-Calixto, 2010).

Por otro lado, se evaluó la capacidad quelante que poseen los compuestos de la reacción de Maillard, que ha sido comprobada *in vitro* sobre sistemas modelo o en café (Morales y col., 2005; Rufian-Henares y Pastoriza de la Cueva, 2009). Esto tendría un efecto sumamente negativo en la salud, especialmente sobre los niños que son especialmente susceptibles (Eastwood, 1992). En nuestro trabajo, los resultados de la absorción mineral aparente en ratas que consumieron una dieta rica en melanoidinas no mostraron diferencias significativas con los de las ratas que se alimentaron con la dieta control ($P > 0,05$). Por el contrario, se encontró que los animales del grupo G-GBT presentaron una menor absorción aparente de minerales ($P \leq 0,05$) que el resto de los grupos. No debemos olvidar que el proceso de cocción genera un gran número de modificaciones en la estructura del alimento, además de la reacción de Maillard. Por lo tanto sería razonable considerar que, a pesar de que el tratamiento térmico a 100 °C por 80 min no generó altas cantidades de compuestos de Maillard, el producto obtenido posee características diferentes que podrían reducir la biodisponibilidad de los minerales disminuyendo el valor de la absorción mineral aparente.

3.4.3.6 Presión arterial

Los ensayos *in vitro* realizados por Rufián-Henares y Morales (2007^{a,b}) demostraron el poder antihipertensivo de las melanoidinas en sistemas modelo y en distintas bebidas (café, cerveza y vino dulce). A partir de estos ensayos, estos autores sugirieron que el efecto antihipertensivo de los compuestos de Maillard podría estar relacionado a la capacidad quelante de las melanoidinas, ya que la angiotensina (hormona que causa la vasoconstricción y posterior aumento de la presión arterial) es zinc dependiente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la idea de que una dieta rica en compuestos de Maillard puede reducir la presión arterial. Tal como se puede ver en la Figura 3.31, el grupo G-GAT presentó una presión arterial significativamente menor a los otros grupos a lo largo de la experiencia ($P \leq 0,05$). Además, al final del período experimental la presión arterial del grupo de animales al que se le incorporó ácido ascórbico a su agua de bebida, fue significativamente menor a la del grupo control y el grupo G-GBT ($P \leq 0,05$).

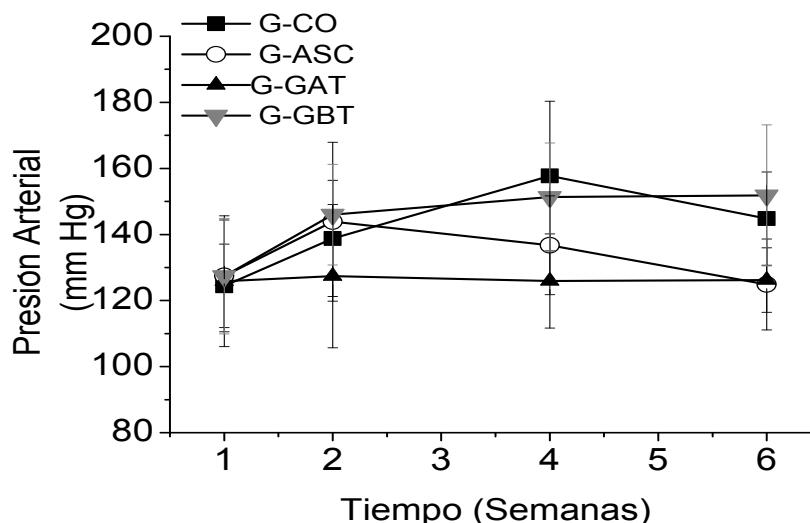


Figura 3.31. Presión arterial de ratas alimentadas con distintas dietas (grupos G-CO, G-ASC, G-GAT y G-GBT). Las barras verticales indican las desviaciones estándar

Para explicar este resultado se determinó la absorción aparente de zinc. En las referencias bibliográficas existe poca información acerca del efecto de los compuestos de Maillard sobre la absorción de zinc *in vivo* y muchas veces los resultados son contradictorios. Sarriá y Vaquero (2001) estudiaron el efecto de los compuestos de Maillard sobre la biodisponibilidad de zinc en ratas lactantes. Sus resultados indicaron que el consumo de una fórmula esterilizada en botella con alto contenido en compuestos de Maillard disminuía la absorción de zinc, comparada con la misma fórmula reconstituida con un menor contenido de compuestos de Maillard. En cambio, resultados recientes obtenidos por Delgado-Andrade y col. (2015) indicaron que el consumo de productos de Maillard provenientes de la corteza del pan no modificaba el balance de zinc en ratas. En el presente trabajo de tesis, los valores obtenidos para la absorción aparente de zinc fueron $89,5 \pm 6,3$; $51,3 \pm 13,0$; $12,3 \pm 13,2$ % para los grupos G-CO, G-GAT y G-GBT, respectivamente. Sin embargo, no se encontró una buena correlación entre este parámetro y la presión arterial de las ratas ($r = -0,14$), aunque sí se encontraron excelentes correlaciones entre la presión arterial y la actividad antioxidante en plasma ($r = -0,86$ y $r = -0,93$ para los ensayos de FRAP y ABTS, respectivamente). Por consiguiente, se podría inferir que la disminución en la presión arterial podría estar asociada al poder

antioxidante que presentaban los compuestos de Maillard. En concordancia con esta teoría Rodríguez-Iturbe y col. (2003) encontraron una significativa disminución en la presión arterial de ratas alimentadas con una dieta rica en antioxidantes. Según estos autores, el estrés oxidativo aumenta la presión arterial al disminuir el contenido de óxido nítrico (un vasodilatador). Sería razonable entonces que el consumo de una dieta rica en antioxidantes como las melanoidinas disminuya la presión arterial.

3.4.4 Efecto de los compuestos de Maillard como conservantes de galletitas

Es claro que el proceso de cocción incrementa el contenido de antioxidantes de productos de panadería (Michalska y col., 2008). Además del efecto fisiológico que pueden presentar estos productos, los antioxidantes generados durante la reacción de Maillard podrían contribuir a prolongar el tiempo de vida útil retardando la oxidación lipídica. Así, Jensen y col. (2011) encontraron que la corteza del pan (rica en malnoidinas) era más estable a la oxidación que la miga en panes preparados con aceite de soja.

Para comprobar este efecto en el producto desarrollado, se prepararon galletitas con aceite de girasol alto oleico y se las horneó bajo dos condiciones distintas: 150 °C por 30 min (con un alto contenido de productos de Maillard) y 100 °C por 80 min (con un bajo contenido de productos de Maillard). Las galletitas se conservaron durante 6 meses en bolsas de polipropileno a 20 °C, y se determinó el PV cada 4 semanas. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de oxidación lipídica para los dos tipos de galletitas ($P > 0,05$). Además, el contenido de peróxidos no aumentó significativamente durante el tiempo de conservación y se mantuvo inferior a los 0,5 mmol de oxígeno por Kg de aceite.

Se determinó también el perfil de ácidos grasos de las galletitas al comienzo y al final del tiempo de conservación, y tampoco se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$). Se podría concluir entonces que las galletitas no sufrieron oxidación lipídica durante su tiempo de conservación. A través de este ensayo se confirmó que las galletitas preparadas con aceite de girasol alto oleico son productos estables a la oxidación durante 6 meses, que es el tiempo de conservación habitual para este tipo de productos (Petersen y col., 1999).

Un análisis más detallado sobre el perfil de ácidos grasos de las galletitas indicó que las mismas presentaban un alto contenido de ácidos grasos insaturados, muy superiores a los valores encontrados por Peterson y col. (2004) en galletitas comerciales argentinas (Tabla 3.9).

Capítulo 3 Galletitas

Tabla 3.9. Perfil de ácidos grasos de aceites extraídos de las galletitas estudiadas en este trabajo. Comparación con datos de referencias bibliográficas (porcentajes expresado en g por cada 100 g de lípidos)

Ácido Graso	Galletita con aceite girasol alto oleico (%)	Galletita dulce comercial* (%)	Galletita de vainilla comercial* (%)	Galletita de chocolate rellena comercial* (%)
Ácido mirístico (14:0)	0,11	2,39	4,29	8
Ácido palmítico (16:0)	4,21	20,76	16,45	13,35
Ácido esteárico (18:0)	2,65	13,23	11	1,8
Ácido oleico (18:1 n9)	83,12	37,25	46,27	11,3
Ácido linoleico (18:2 n6)	9,08	16,15	9,19	28,05
Ácido γ-linolénico (18:3 n3)	ND	0,7	1,29	2,2
16:1 n7	ND	2,99	4,39	1,8
Σ Insaturados	92,2	57,09	61,14	43,35

* Datos de referencias bibliográficas (Peterson y col., 2004)

ND: No detectado

Estos resultados indicarían que las galletitas preparadas con aceite de girasol alto oleico podrían ser una alternativa saludable para obtener un producto de prolongada vida útil, y podría reemplazar las grasas y aceites hidrogenados utilizados habitualmente en la industria galletera.

3.5. CONCLUSIONES PARCIALES

- De los tres aceites ensayados (maíz, girasol y girasol alto oleico) el más recomendado para la formulación de galletitas fue el aceite de girasol alto oleico, por su bajo grado de oxidación durante el tiempo de conservación de 6 meses, sin ningún antioxidante adicional.

El principal limitante de la vida útil de galletitas con bajo contenido de lípidos es la absorción de humedad del ambiente (que aumenta la a_w del producto) siendo la textura el parámetro físico que se ve más perjudicado. El aumento en la a_w genera que el producto pierda dureza y se vuelva más gomoso. La textura de las galletitas no sólo estaría relacionada con su a_w , sino también con el nivel de oxidación de la fase lipídica.

- El uso de aceite de girasol alto oleico para la preparación de galletitas permite obtener un producto con un alto contenido de ácidos grasos insaturados, superiores a los valores encontrados por otros investigadores en galletitas comerciales argentinas.

Se podría concluir entonces que las galletitas preparadas con aceite de girasol alto oleico podrían ser una alternativa saludable para obtener un producto de prolongada vida útil y podría reemplazar las grasas y aceites hidrogenados utilizados habitualmente en la industria galletera.

- El tratamiento térmico es indispensable para obtener una galletita con un contenido de humedad final inferior al 12 % (de acuerdo a exigencias del CAA). Se puede alcanzar esta condición con distintos tiempos y temperaturas de horneado. Tratamientos térmicos más severos (mayor tiempo o temperatura) incrementan el nivel de compuestos con capacidad antioxidante, siendo mayor la capacidad antioxidante cuando la cocción se realiza a una mayor temperatura – menor tiempo.

Entre los parámetros de color evaluados, los que mejor representan el desarrollo del pardeamiento no enzimático fueron los parámetros L^* y el ΔE .

Los compuestos de Maillard generados presentan una importante actividad antioxidante, que puede ser cuantificada por las técnicas de FRAP y DPPH. En cambio, la técnica de ABTS no resultó sensible al poder antioxidante de estos productos, por lo que no sería recomendada para cuantificar la capacidad antioxidante de productos horneados como las galletitas.

- Mediante el proceso de digestión seguido de fermentación fue posible liberar casi la totalidad de los compuestos de Maillard con capacidad antioxidante presentes en las galletitas. Esto indica la importancia de incorporar el paso final de fermentación en el análisis de alimentos que contengan compuestos antioxidantes derivados de la reacción de Maillard. Sin embargo, los compuestos bioactivos liberados sólo podrían absorberse en el intestino delgado, mientras que en el intestino grueso su actividad sería *in situ*.

- El ensayo *in vivo* mostró que uso de altas temperaturas en la cocción de galletitas disminuiría la digestibilidad proteica, reduciendo la eficiencia alimentaria y provocando una disminución en el peso de los animales que hayan consumido este tipo de alimento.

Por otro lado, el consumo de una dieta con altas concentraciones de compuestos de Maillard provenientes de galletitas incrementaría la actividad antioxidante del suero y disminuiría su nivel de oxidación lipídica.

Además, el consumo de galletitas con alto contenido de melanoidinas contribuiría a disminuir la presión arterial. Se encontró una buena correlación entre la presión arterial y la actividad antioxidante en el suero, pero no entre la presión arterial y la absorción aparente de zinc. Esto sugiere que el efecto antihipertensivo de los compuestos de Maillard estaría relacionado a su poder antioxidante, y no a la capacidad quelante de zinc como se había sugerido en bibliografía a partir de ensayos realizados *in vitro*.

Los resultados de este capítulo son consistentes con la idea de que los compuestos de Maillard se comportan como fibra dietaria: modulan eficientemente la composición de la microbiota fecal incrementando la relación de bacterias lácticas sobre bacterias totales, y aumentan la capacidad de retención de agua de la materia fecal.

El consumo de una dieta rica en compuestos de Maillard no disminuiría la absorción mineral aparente.

Capítulo 4



Mieles y Rellenos



4.1 INTRODUCCIÓN

Por la versatilidad de los rellenos de galletitas se puede obtener un amplio espectro de nuevos productos. Sin embargo, los componentes principales de la crema base son en general una fase grasa y azúcar, por lo que se los considera similares al chocolate (Manley, 2000).

Sobre la crema base de los rellenos se pueden incorporar distintos saborizantes y colorantes, ya sean naturales o sintéticos. Es habitual encontrar rellenos con sabor a chocolate o a vainilla, así como también sabores frutales como limón o frutilla (Manley, 2000). Generalmente el sabor de los productos guarda una estrecha relación con los colorantes utilizados, ya que el color del relleno se corresponde con su sabor (Manley, 2000). En algunos casos se incorpora lecitina como emulsificante, para disminuir el tiempo de mezclado de la crema; sin embargo, esto puede generar un producto con una textura demasiado suave.

4.1.1 Composición de los rellenos

4.1.1.1 Hidratos de carbono

En los rellenos, la sacarosa (el azúcar más utilizado para aportar el sabor dulce) debe estar finamente particulada, de modo de no generar una textura desagradable al momento del consumo; en general se considera que un tamaño de partícula de 40 μm es aceptable para rellenos dulces. Los polisacáridos como el almidón de trigo o de arroz, si bien no aportan sabor, han sido utilizados para incrementar el contenido de sólidos y como agentes captadores de agua, para disminuir la actividad acuosa del relleno (Manley, 2000).

4.1.1.2 Lípidos

El efecto de la fase grasa en los rellenos es un poco más complejo. La consistencia de la crema está fuertemente relacionada con el contenido de sólidos de la fase grasa, que a la vez define en gran medida la textura y el *mouthfeel* del producto (Manley, 2000). Existen ciertos aspectos tecnológicos a considerar: es necesario que la crema pueda fluir al momento de rellenar las tapas, pero luego debe ser firme al momento de su consumo a temperatura ambiente. Por otro lado, la firmeza de la crema en el producto final debe ser suficiente para poder mantener la estructura de la galletita rellena, aunque si es demasiado dura puede sentirse “seca”. Además, al ser mordido el relleno no debe escurrir por los costados del producto. También es deseable que, una vez en la boca, la crema funda rápidamente, de modo tal de liberar los componentes de la matriz, como el azúcar y los saborizantes, para poder percibir su sabor. Considerando esto, se recomienda utilizar grasas como la manteca de cacao o aceites vegetales hidrogenados (Manley, 2000). Como se mencionó anteriormente los aceites

vegetales hidrogenados son poco recomendados desde el punto de vista nutricional: poseen alto contenido de ácidos grasos saturados y grasas *trans*. Los efectos adversos sobre la salud de los ácidos grasos *trans* son bien conocidos: su consumo incrementa los niveles del colesterol LDL y disminuyen el colesterol HDL (Peterson y col., 2004). En Argentina una de cada tres galletitas rellenas disponibles en el mercado, contienen ácidos grasos *trans* (Gutierrez Sieiro, 2014). Es por esto que en algunos casos se ha recomendado eliminar las galletitas rellenas de la dieta de niños (Duhagon y col., 2005).

La manteca de cacao, por otro lado, es rica en ácidos grasos saturados, poco recomendados para su consumo ya que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis (Valussi y Minto, 2016). Sin embargo, el principal ácido graso de los triglicéridos del cacao es el ácido esteárico (18:0), que tiene un efecto distinto al de otros ácidos grasos saturados, ya que no incrementa el colesterol sérico (Afoakwa, 2016). Estudios realizados por Bonanome y Grundy, (1988) sobre voluntarios sanos demostraron que el consumo de una dieta rica en ácido esteárico reduce un 10 % el contenido de colesterol al compararlo con el consumo de una dieta con ácido palmítico (16:0) como principal ácido graso constituyente de los triglicéridos. Además, en este estudio, quienes habían consumido la dieta rica en ácido esteárico presentaron una reducción del nivel de LDL del 21 %, mientras que los sujetos que habían consumido una dieta rica en ácido oleico redujeron su nivel de LDL en un 15 %. Estos autores concluyeron entonces que el consumo de ácido esteárico presentaría efectos similares al consumo de ácido oleico. En un trabajo más reciente, Valussi y Minto, (2016) analizaron los resultados de múltiples ensayos, en donde se evaluaba la relación entre la salud coronaria y el consumo de chocolate. De acuerdo al trabajo de estos investigadores, existe evidencia suficiente para concluir que el ácido esteárico presente en la manteca de cacao tendría un efecto no aterogénico, y es improbable que su consumo implique un riesgo para la salud cardiovascular. El mecanismo por el cual esto ocurre no está del todo claro, pero estaría relacionado a que su absorción intestinal es más lenta que la de otros ácidos grasos, y a que *in vivo* podría ocurrir una transformación del ácido esteárico a un ácido graso monoinsaturado (Valussi y Minto, 2016).

4.1.1.3 Fibra dietaria e hidrocoloides

En general, los rellenos de galletitas son productos con un bajo nivel de fibra (Passos y col., 2013). Las fibras son componentes alimenticios no digeribles por las enzimas del tracto intestinal, por lo que no aportan energía aprovechable, aunque una pequeña fracción puede ser metabolizada por los microorganismos del intestino grueso generando productos absorbibles (BeMiller y Whistler, 2010). Las fibras han sido muy estudiadas en los últimos años por sus

efectos beneficiosos sobre la salud: disminuyen el colesterol en sangre, aumentan la sensación de saciedad porque retardan el vaciado gástrico, disminuyen la respuesta glicémica y por su efecto prebiótico mejoran la salud intestinal. Además, aumentan el volumen de las heces favoreciendo su tránsito intestinal, reducen el riesgo de sufrir ciertas patologías como la constipación, la diverticulitis, el cáncer de colon, de recto, etc. (Ashwell, 2002; López y Suárez, 2003; Mudgil y Barak, 2013; Lupano, 2013). Entre las fibras que podrían incorporarse a los rellenos de galletitas se incluye la fibra soluble de avena (Battaiotto y col., 2015). Este producto ha sido aprobado por la *American Dietetic Association* como beneficioso para la salud; su consumo se asocia a la disminución del riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, ya que disminuye los niveles de lípidos y colesterol en sangre (Hasler y Brown, 2009, Xu, 2012; Gao y col., 2015).

Para mejorar y estabilizar la textura de los rellenos es habitual incorporar hidrocoloides a su formulación (Battaiotto y col., 2012). Muchos de estos estabilizantes son polisacáridos como la goma arábica, la goma guar o la carboximetilcelulosa (Lindsay, 2010). Otros, como la gelatina, son proteínas. Los hidrocoloides presentan múltiples propiedades funcionales dependiendo de su estructura química. Por ejemplo, la goma xántica es soluble tanto en agua caliente como fría y confiere una alta viscosidad a bajas concentraciones. Además, posee una buena capacidad para estabilizar suspensiones y emulsiones. Estas propiedades se deben a la rigidez y la estructura extendida de su molécula, la cual se puede observar en la Figura 4.1 (BeMiller y Huber, 2010).

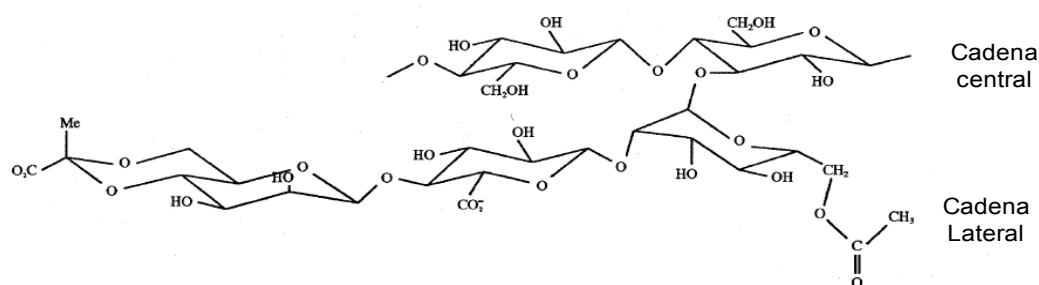


Figura 4.1. Estructura de repetición de la molécula de xantano (Adaptado de BeMiller y Huber, 2010)

4.1.1.4 Ingredientes beneficiosos para la salud

Existen algunos trabajos en donde se ha apuntado a mejorar ciertos aspectos nutricionales de los rellenos de galletitas para obtener un producto más saludable. Considerando los beneficios de los ácidos grasos ω -3 como el eicosapentaenoico (EPA 20:5, n-3) y el docosahexaenoico (DHA, 22:6, n-3), Borneo y col. (2007) elaboraron un relleno de galletita incorporando encapsulados de EPA+DHA de buena aceptabilidad y estables durante

un almacenamiento de 28 días. Tanti y col. (2016) obtuvieron un relleno de galletita similar a los del mercado, a partir del reemplazo parcial o total de los *shortenings* en los rellenos por aceite de canola estructurado preparado a partir de hidroxipropilmetilcelulosa y metil celulosa. Por otro lado, Barroso y col (2015) lograron un producto de buena aceptabilidad al reemplazar el cacao de los rellenos de galletitas por polvo de algarrobo (*Ceratonia siliqua*). Los trabajos de Quintero Gutiérrez y col. (2003, 2012, 2008) y González-Rosendo y col. (2010) evaluaron la incorporación de hierro altamente biodisponible (hierro hémico) en rellenos de galletitas, de modo tal de obtener un producto dirigido a suplir las deficiencias de los grupos más vulnerables (mujeres adolescentes, embarazadas, en período de lactancia y niños).

Estos estudios indican que sería posible mejorar la composición de los rellenos de las galletitas obteniéndose productos más saludables y de buena aceptabilidad. Además, como su procesamiento no implica un tratamiento térmico, los rellenos podrían actuar como vehículos de compuestos bioactivos termolábiles como los antioxidantes.

4.1.2 Miel

El Código Alimentario Argentino en su capítulo X (CAA, 2010) define la miel como “El producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, almacenándolo en panales, donde madura hasta completar su formación”. La miel se puede distinguir según su origen en: miel de flores, que procede principalmente de los néctares de las flores, y miel de mielada, que procede principalmente de exudaciones de las partes vivas de las plantas. La miel floral se obtiene a partir del néctar, mientras que la mielada se obtiene indirectamente: ciertos insectos hemípteros se alimentan del floema (rico en materia orgánica) de distintos árboles o arbustos y excretan un líquido dulce que es recogido por las abejas (Baldi, 2010).



La composición de la miel es compleja y su caracterización ha sido siempre un desafío, ya que depende no sólo de su origen floral sino también de su procedencia geográfica (Beretta y col., 2005; Wilczyńska, 2014).

En general se puede considerar que la miel se compone principalmente de azúcares, fundamentalmente fructosa y glucosa, y también sacarosa y otros azúcares superiores, que representan casi un 80 %, mientras que el contenido de agua ronda el 17 %. Entre los componentes minoritarios se encuentran los minerales (0,17 %), compuestos nitrogenados (0,04 %), y en menor medida ácidos libres, lactonas, etc (Baldi, 2010).

Los minerales en la miel pueden provenir del néctar, de la fuente de mielada, o del polen que contiene la miel (Baldi, 2010). Nuestro grupo de trabajo ha encontrado en mieles de la provincia de Buenos Aires un contenido aproximado de 76 % de potasio, 11 % de calcio, 10% de sodio y bajas concentraciones de otros minares como cobre, magnesio, hierro y zinc (0,95; 0,94; 0,55 y 0,34 %, respectivamente) (Patrignani y col., 2015^b). Los minerales que se encuentran como elementos traza son de gran interés, ya que se pueden relacionar con el origen floral o geográfico de la muestra, o pueden ser indicadores de alguna contaminación en el producto (Baldi, 2010).

Así, es importante destacar que el contenido de metales pesados en ciertos casos se utiliza como indicador de contaminantes ambientales (Perna y col., 2012; Alves y col., 2013). Por ejemplo, el contenido de cobre o plomo en miel puede ser un indicador de contaminación de origen antropológico en suelo o el aire (Baroni y col., 2009, Bogdanov y col., 2007).

El porcentaje de proteínas en la miel es muy bajo, en general no supera el 1,6 %. Las proteínas y los aminoácidos provienen de las abejas o, en mayor medida, del polen (da Silva y col., 2016). Una pequeña fracción de las proteínas de la miel corresponde a enzimas, como la invertasa, la catalasa y la diastasa, que, si bien no presentan un gran valor desde el punto de vista alimenticio, son importantes ya que algunas de ellas son indicadores de calidad y frescura de la miel (Baldi, 2010; da Silva, 2016).

La miel contiene cantidades bajas de vitaminas, como las vitaminas del complejo B: tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8) y ácido fólico (B9), y el ácido ascórbico (da Silva y col., 2016).

Contiene además gran variedad de compuestos fenólicos que se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química en no-flavonoides (derivados del fenol) y flavonoides (flavonas, isoflavonas y chalconas). La característica de estos compuestos es que poseen un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilo en su estructura (da Silva y col., 2016). Algunos ejemplos de estos compuestos presentes en mieles se pueden observar en la Figura 4.2.

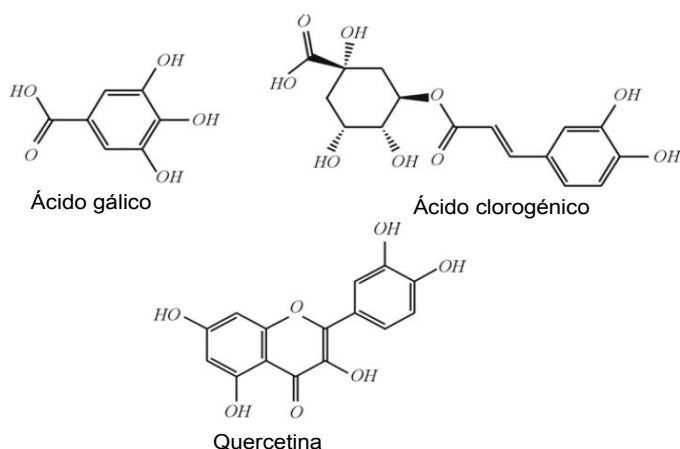


Figura 4.2. Estructura de algunos compuestos fenólicos y flavonoides encontrados en mieles (adaptado de Kaškonienė y col., 2009)

El interés particular de estos compuestos es su acción como antioxidantes, ya que captan radicales libres inhibiendo la peroxidación lipídica (da Silva y col., 2016). Además, se ha sugerido que tienen una estrecha relación con las propiedades beneficiosas para la salud que presenta la miel.

El flavor de la miel no sólo está relacionado con su dulzura sino también con su aroma, que depende de los compuestos volátiles presentes. Si bien el estudio de los aromas en la miel no se ha abordado de manera exhaustiva por su extrema complejidad, se han encontrado más de 400 compuestos (da Silva y col., 2016). Entre ellos hay ésteres de ácidos alifáticos, (como acetato de metilo, etilo, propilo, propionato de etilo, etc.), o aromáticos (benzoatos), aldehídos (formaldehído o acetaldehído), cetonas y alcoholes (derivados del metanol, etanol, propanol, etc). Algunos de estos compuestos se asocian al origen floral de la miel, como el formaldehído y el acetaldehído de las mieles de colza (*Brassica napus*) y de trébol (*Trifolium spp.*). El origen de estos compuestos volátiles es diverso: algunos se relacionan al tipo de néctar, otros a la fisiología de la abeja, mientras que otros se originan por reacciones químicas o enzimáticas que ocurren durante el tiempo de conservación (como los aldehídos furánicos) (Baldi, 2010). También existen compuestos como el 1,2-dibromoetano, el 1,2-diclorobenceno y el naftaleno, que pueden estar presentes en las mieles, pero su presencia se debe a factores antropogénicos, ya que los productores los utilizan para el control de plagas (Tananaki y col., 2005^a).

4.1.2.1 Beneficios del consumo de miel

Los múltiples beneficios de la miel se conocen desde los tiempos de los antiguos egipcios y los sumerios; estos pueblos la usaban para tratar enfermedades oculares y de la piel. Por otro lado, los antiguos griegos la utilizaban para mejorar el rendimiento de los atletas, e Hipócrates documentó su uso para infecciones y heridas (Chepulis, 2008).

En los últimos años, se ha renovado el interés por la miel. Este producto genera un índice glucémico menor que la sacarosa, y se ha demostrado que su consumo es beneficioso para pacientes con diabetes (Bogdanov y col., 2008). La evidencia actual indica que este producto natural presenta diferentes beneficios: efecto gastro y hepatoprotector, antihipertensivo, antimicrobiano, antiviral, antiparasitario, antimutagénico, antitumoral y antiinflamatorio (Erejuwa y col., 2012; Bogdanov y col., 2008). Se ha observado también que el consumo de miel genera una recuperación más rápida de la intoxicación alcohólica, probablemente por el aumento en la tasa de excreción del etanol (Bogdanov y col., 2008).

En general se considera que la mayor parte de los beneficios de la miel se relacionan con su efecto antioxidante. El consumo de miel mejoraría el estado general de las defensas

antioxidantes propias del organismo, como la superóxido dismutasa (que cataliza la dismutación del anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular), la catalasa (cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua), y la glutatión peroxidasa (GPX). Entre las defensas no enzimáticas del organismo que también se pueden modificar por el consumo de miel se incluyen el glutatión (GSH) y vitaminas como la C y la E (Erejuwa y col., 2012). El efecto del consumo de miel sobre las defensas y marcadores del estrés oxidativo en distintos órganos se resumen en la Tabla 4.1

Tabla 4.1. Resumen del efecto antioxidante de la miel observado en ensayos *in vivo* sobre distintos órganos (adaptado de Erejuwa y col., 2012)

Órgano/Diseño experimental	Estado de estrés oxidativo					
	Control			Miel		
Tracto gastrointestinal/ ratas con colitis inducida	↑MDA ↓GPX	↓SOD ↓GSH	↓CAT	↓MDA ↑GPX	↑SOD ↑GSH	↑CAT
Hígado/ratas con lesión hepática inducida	↑GPX ↑MDA	↑CAT ↑TAC	↓GSH	↓GPX ↓MDA	↓CAT	↑GSH
Páncreas/ ratas con diabetes inducida	↑SOD ↑MDA	↑GPX	↓CAT	↓SOD ↓MDA	↓GPX	↑CAT
Plasma-Suero/ ratas diabéticas	↑MDA	↓GPX	↑	↓MDA	↑GPX	
	compuestos glicosilados			↓compuestos glicosilados		
Órganos reproductores/ estrés seminal en ciclistas expuestos a trabajo intenso	↓CAT	↓SOD	↓TAC	↓MDA ↑CAT	↓ROS ↑TAC	↑SOD

SOD, superóxido dismutasa; CAT catalasa, GPX glutatión peroxidasa, ROS, *oxigen reactive species* (compuestos reactivos del oxígeno), GSH glutatión reducido, TAC capacidad antioxidante total, MDA malonaldehído. ↓: reduce; ↑: aumenta

4.1.2.2 Uso de miel en productos alimenticios

Aunque la mayor parte de la producción de miel se destina al consumo directo, aproximadamente un 10 % se utiliza para la elaboración de distintos productos, no sólo en el área de alimentos sino también en las áreas farmacéutica y cosmética (Baldi, 2010).

Por su sabor es habitual encontrar la miel en alimentos en reemplazo de otros hidratos de carbono como la sacarosa. El reemplazo de sacarosa por miel tiene múltiples beneficios. Chepulis y Starkey (2008) compararon el efecto del consumo de una dieta rica en sacarosa con una dieta rica en miel en ratas Sprague Dawley alimentadas durante 12 meses (dietas isocalóricas). Estos autores encontraron que los animales que habían consumido sacarosa presentaron mayor contenido de glucosa en sangre, un menor valor de colesterol HDL y un peso final superior al de los animales que habían consumido las dietas con miel.

Por otro lado, la fructosa es el principal hidrato de carbono en la mayoría de las mieles. Este glúcido es muy consumido actualmente en forma de “jarabe de maíz de alta fructosa”, y se

ha considerado una de las causas de obesidad. Este jarabe tiene un efecto negativo sobre la regulación de la energía y el peso corporal porque acelera el proceso de lipogénesis (Kasangian, 2012). Se podría pensar entonces que el uso de miel en la dieta podría generar efectos similares por su alto contenido de fructosa. Sin embargo, en ensayos sobre ratas, el efecto hipertrigliceridémico observado después de la ingesta de fructosa no se observó luego del consumo de miel. Además, los animales alimentados con miel tuvieron mayores niveles de α -tocoferol, una mayor proporción de α -tocoferol/triacilglicerol y una menor susceptibilidad a oxidación lipídica cardíaca (Bogdanov y col., 2008).

A partir de estos resultados se puede considerar que la miel sería una alternativa saludable para reemplazar al jarabe de alta fructosa y a la sacarosa en la dieta. Actualmente en el mercado existen distintos productos formulados con miel. En Alemania, se prepara un pan dulce conocido como Lebkuchen, mientras que en la cocina judía el “Leicaj” es una torta de miel que se consume para dar inicio al Año Nuevo. La industria láctea también utiliza la miel en la elaboración de productos como yogurt con miel, queso crema con miel (Philadelphia®) y leche con miel, comercializada en Alemania (Baldi, 2010). En cuanto a la incorporación de miel en snacks, se puede nombrar al maní tostado con miel y a las papas fritas con miel (consumidas en Corea del Norte). Otro producto que se encuentra habitualmente en el mercado son los cereales para el desayuno que contienen miel, como los “corn flakes” o los “anillos de miel”. También se pueden encontrar frutas secas con miel o productos alcohólicos como la hidromiel, bebida procedente de la fermentación alcohólica de la miel diluida en agua potable. Algunos de estos productos se pueden observar en la Figura 4.3.



Figura 4.3. Productos preparados con miel que se pueden encontrar en el mercado: turrón (A) maní con miel (B), queso crema con miel (C), frutas secas con miel (D), anillos con miel (E) e hidromiel (F)

4.2 OBJETIVOS

Objetivo general del capítulo

Incorporar miel con alto contenido de antioxidantes a la formulación de rellenos de galletitas en reemplazo parcial de la fase grasa y del azúcar refinado

Objetivos específicos

- Evaluar mieles de distintas regiones de Argentina para su posterior incorporación a rellenos de galletitas, considerando su actividad antioxidante, su contenido de fenoles totales, su contenido de humedad y su perfil de compuestos volátiles.
- Reemplazar parcialmente la fase grasa y el azúcar refinado de rellenos de galletitas por miel con un alto contenido de antioxidantes, logrando un producto con una textura similar a los disponibles en el mercado, pero más saludable.
- Evaluar el tiempo de vida útil del producto y comprobar la estabilidad de los antioxidantes de la miel durante el tiempo de conservación.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Ingredientes utilizados

Manteca de cacao (Callebaut®), fibra de avena (Droguería Saporiti, Argentina), azúcar impalpable (Dos Anclas®, Argentina), goma xántica (Droguería Saporiti SA, Argentina), almidón de maíz (Maizena Duryea®, Unilever de Argentina S.A.) y miel obtenida directamente de productores argentinos.

4.3.2 Caracterización de mieles argentinas

Los ensayos de caracterización de miel (con excepción de la determinación de antioxidantes) se realizaron en el Laboratorio de Apicultura (Bee-Lab) de la Facultad de Agricultura Forestal y Ambiente de la Universidad Aristotélica de Salónica, ubicada en la ciudad de Salónica, Grecia.

4.3.2.1 Recolección de muestras

La capacidad antioxidante de las mieles argentinas depende de su origen geográfico (Patrignani y col., 2015^b y 2016). Por este motivo, en el año 2014 se recolectaron mieles de distintas regiones para determinar cuál sería la más adecuada para su uso en rellenos de galletitas con alto contenido en antioxidantes.

La provincia de Buenos Aires se divide en 7 regiones fitogeográficas, cada una con sus características distintivas: Provincia Paranaense, Provincia del Espinal distrito del Talar y distrito del Caldén, Provincia Pampeana distrito Oriental, distrito Occidental y distrito Austral, y Provincia del Monte (Figura 4.4) (Cabrera, 1968). Se analizaron mieles de la región Paranaense (6 muestras), de la Provincia del Espinal distrito del Talar (6 muestras) y de la provincia Pampeana, distrito Oriental (6 muestras).



Figura 4.4. Regiones fitogeográficas de la provincia de Buenos Aires, Argentina

Se analizaron además 8 muestras de productores de la región Andina Patagónica ubicada al sur de la Argentina. Si bien en los últimos años esta región ha aumentado su nivel de producción, estas mieles no han sido correctamente caracterizadas aún.

En total se analizaron 26 mieles sobre las que realizaron las siguientes determinaciones:

4.3.2.2 Humedad de mieles

El contenido de humedad de la miel es una de sus características más importantes, ya que condiciona su tiempo de conservación y sus cualidades organolépticas (Cervera y Cervera, 1994). Se ha encontrado una relación lineal entre el contenido de humedad de la miel (entre humedades de 14,8 y 18,8 %) y la a_w (entre 0,490 y 0,600) (Baldi, 2010). En la Argentina, el Código Alimentario permite un contenido de humedad máximo del 20 % para asegurar un producto de alta calidad y de prolongada vida útil.

El contenido de humedad de la miel se determinó indirectamente a partir del índice de refracción. Para esto se colocaron con una varilla de vidrio limpia y seca unas gotas de miel entre los prismas de un refractómetro y se realizó la lectura. Luego, a partir de tablas y considerando la temperatura ambiente se relacionó el índice de refracción con la humedad de la miel a 20 °C (IRAM 15931, 1994; Bogdanov y col., 2002).

4.3.2.3 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica de una solución es una medida de su capacidad de transportar la corriente eléctrica. En la miel la conductividad se debe principalmente a la presencia de sales minerales y ácidos orgánicos (Cervera y Cervera, 1994). A pesar de que la conductividad en la miel es muy baja (del orden de los milisiemens) este valor es muy importante ya que muchas veces se lo considera un criterio de origen botánico de la miel y es muy utilizado en los análisis de rutina (Bogdanov y col., 2002; Baldi, 2010).

Para realizar la medida se pesó una cantidad de miel que correspondía a 5,00 g en masa seca. Se la disolvió en agua destilada y se la llevó a 25 ml de volumen final. Se sumergió el conductímetro (Cond 315i/Set WTW, Alemania) en la solución obtenida y se expresó el resultado en mS/cm (IRAM 15945, 1994; Bogdanov y col., 2002).

4.3.2.4 Color de mieles

El color de la miel tiene gran importancia comercial, ya que determina su valor económico (Baldi, 2010). Para realizar esta medida se utilizó un equipo electrónico Hanna, HI 8322 (Rumania). Este equipo mide el porcentaje de luz transmitida por una muestra de miel

libre de burbujas y cristales, comparándola con la luz transmitida por el glicerol. El instrumento da directamente los resultados en mm Pfund.

Los grados de color basados en la escala Pfund son los siguientes: lectura ≤ 8 mm: blanco agua; $8 < \text{lectura} \leq 16$: extra blanco; $16 < \text{lectura} \leq 34$: blanco, $34 < \text{lectura} \leq 50$: ámbar extra claro; $50 < \text{lectura} \leq 85$: ámbar claro; $85 < \text{lectura} \leq 144$: ámbar y más de 114: oscura. Como ejemplo, en la Figura 4.4. se puede ver el color de mieles obtenidas de distintas regiones de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.



Figura 4.4. Muestras de miel de diferentes colores: 1, blanco agua; 2-4 blanco; 5 ámbar extra claro; 6-7 ámbar claro; 8 ámbar. (Extraído de Patrigani y col., 2016)

4.3.2.5 Parámetros de frescura de miel

Los dos métodos más utilizados para determinar la frescura de la miel son las medidas del contenido de hidroximetilfurfural (HMF) y la actividad diastásica.

- **Hidroximetilfurfural (HMF)**

El HMF se produce por la deshidratación de los azúcares. Este valor se considera un indicador del envejecimiento o daño térmico de la miel, ya que una miel fresca no contiene HMF, y éste aumenta con el transcurso del tiempo o debido al procesamiento térmico (Agurto Mendez y Peralta Madariaga, 2010).

La medida se realiza espectrofotométricamente a 284 nm. Básicamente, se determina la absorbancia de la muestra de miel contra una referencia en la que se destruyó el HMF con bisulfito de sodio.

La determinación se realizó de acuerdo a la norma IRAM 15937 (1995). Se pesaron $5,0000 \pm 0,0002$ g de miel en un vaso de precipitado y se disolvieron con agua destilada. La solución se llevó a un matraz de 50 ml al que se le agregaron 0,5 ml de reactivo clarificante Carrez I ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 15 %p/v), se agitó bien y se agregaron 0,5 ml de reactivo clarificante

Carrez II ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 %p/v), se agitó nuevamente y se llevó a volumen. A continuación la muestra se filtró a través de un papel de filtro, desechando los primeros 10 ml.

Se prepararon dos tubos de ensayo, a cada uno se les agregaron 5 ml de la muestra filtrada. A uno de los tubos (tubo muestra) se le agregaron 5 ml de agua destilada, mientras que al otro, (tubo referencia), se le agregaron 5 ml de una solución de bisulfito de sodio recién preparada (0,2 % p/v). Se agitaron los tubos y se midió la absorbancia de cada uno a 284 y 336 nm utilizando un espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific (G 105 UV-VIS Madison, Estados Unidos). El contenido de HMF en miel en mg por Kg se calculó considerando la diferencia de absorbancia entre la muestra y la referencia a 284 y a 336 nm, tal como se describe en la norma IRAM 15937 (1995).

- **Actividad diastásica**

Las enzimas tienen un gran valor como indicadores de calidad y frescura de la miel. El nombre genérico diastasa se aplica al grupo de α - y β -amilasa, aunque en la miel se ha demostrado que sólo está presente la α -amilasa producida por las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras (Baldi, 1998).

La actividad de esta enzima disminuye durante el almacenamiento o calentamiento, por lo que se la considera un indicador de frescura (Ulloa y col., 2010). La medida de la actividad diastásica en miel se basa en la capacidad que tiene la enzima de hidrolizar el almidón. La cuantificación se realiza midiendo a distintos intervalos de tiempo la absorbancia del complejo coloreado yodo-almidón a 660 nm (Baldi, 1998).

Para la determinación que se utiliza como método de referencia (Bogdanov y col., 1999), se pesaron 5,0000 g de miel y se agregaron 15 ml de agua destilada para disolverla. Luego se trasvasó cuantitativamente la solución obtenida a un matraz de 25 ml sobre el que se agregaron 1,5 ml de una solución de NaCl (2,9 %, p/v) y se llevó a volumen con buffer acetato (pH = 5,3). Se colocaron 10,0 ml de la muestra en un tubo de ensayo y se termostató a 40 °C.

Paralelamente se preparó una solución de almidón pesando 1,000 g de almidón, al que se le incorporaron 30 ml de agua destilada. El almidón se solubilizó colocándolo en un baño de agua en ebullición durante 1,5 min con agitación constante. Inmediatamente después se enfrió bajo chorro de canilla y se llevó a un volumen final de 50,0 ml. La solución obtenida se termostató a 40 °C.

La solución de yodo (I_2 - KI) a utilizar se preparó también en el momento. Para esto, se pesaron 10 g de KI, y se llevaron a un matraz de 250 ml cubierto con papel de aluminio, arrastrándolo con agua destilada. Luego se agregaron 2,5 ml de una solución madre de yodo

(preparada a partir de 5,5 g de I_2 + 11 g de IK en un volumen final de 250 ml). La mezcla se agitó enérgicamente y se llevó a volumen.

Para comenzar la reacción se agregaron 5 ml de la solución de almidón sobre los 10 ml de la muestra termostatizada a 40 °C y se agitó enérgicamente. A distintos tiempos de reacción se tomó 1 ml de la solución y se la descargó en un erlenmeyer que contenía 50 ml de agua y 10 ml de la solución de I_2 -KI. El erlenmeyer se agitó enérgicamente y se midió inmediatamente la absorbancia a 660 nm. El contenido de agua en el erlenmeyer fue ajustado en cada ensayo para obtener una absorbancia de la solución yodo-almidón en el rango de 0,745-0,770. Las medidas se realizaron hasta obtener al menos 3 valores en un rango de absorbancia entre 0,5 y 0,2.

Una vez finalizada la determinación, se graficó la absorbancia obtenida en función del tiempo de reacción. Sobre este gráfico se determinó el tiempo necesario para alcanzar una absorbancia de 0,235 (t_x). El índice diastasa (ID) se calculó luego de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{300}{t_x} \quad \text{Ec. 4.1}$$

Este número expresa la actividad de la diastasa en ml de solución de almidón al 1 % hidrolizada por la enzima contenida en un gramo de miel, en una hora, a 40 °C. Este índice de diastasa corresponde al número de la escala Gothe.

Para comprobar la precisión del método, junto con las muestras se determinó el ID de una muestra de referencia.

4.3.2.6 Determinación de compuestos volátiles

El análisis de los compuestos volátiles en miel tiene múltiples aplicaciones. Por un lado el perfil de volátiles define el aroma del producto, y en muchos casos los compuestos identificados han sido utilizados como indicadores del origen floral y/o geográfico de la miel. Además, compuestos como los furanos, que pueden ser formados vía reacción de Maillard en miel, son utilizados como indicadores del tratamiento térmico y del tiempo de conservación (Escriche y col., 2009). Por otro lado, mediante este análisis en miel es posible determinar la presencia de compuestos utilizados para la fumigación o control de plagas de las colmenas, potencialmente tóxicos para la salud (Tananaki y col., 2005^a).

La determinación del perfil de compuestos volátiles en mieles se basa en tres pasos consecutivos: extracción, separación y caracterización.

- Extracción de los compuestos volátiles en miel

La extracción de los compuestos volátiles en mieles se llevó a cabo tal como se describe en el trabajo de Tananaki y col. (2007), utilizando una técnica conocida como “purga y trampa”. Se colocaron 10 g de miel perfectamente pesados en un tubo de vidrio al cual se le agregó agua bidestilada (10 g) y 15 μ L de un patrón interno (estireno 10 ppm en acetona). La mezcla se agitó enérgicamente hasta la total homogeneización de la miel con el patrón interno.

Para la extracción de la fracción volátil, la miel se termostatóizó a 40 °C en un equipo Water Soil Autosampler OI Analytical 4552 durante 2 min. Luego se inyectó helio (caudal 30 ml/min) como gas de arrastre durante 30 min. El burbujeo de este gas facilita la liberación de los compuestos volátiles que fueron luego trapeados en un recolector de muestra (Sample Concentrator OI Analytical 4560) revestido con una resina adsorbente (Tenax TA). Luego, la desorción de los compuestos retenidos en esta resina se realizó aumentando la temperatura de la cámara hasta 180 °C por 7 min. Una vez liberados los analitos, éstos fueron transportados hacia el cromatógrafo gaseoso para su posterior separación y análisis.

- Separación y caracterización de los compuestos volátiles

Los compuestos aislados se separaron utilizando un cromatógrafo gaseoso (GC) Agilent 6980 con una columna capilar SGE BPX5 (30 m; 0,25 mm; 0,25 μ m). Para la separación de las muestras se utilizó el siguiente programa de temperatura: 40 °C durante 5 min, luego se incrementó la temperatura a 55 °C a una velocidad de 1 °C/min; después la temperatura se elevó desde 55 °C hasta 120 °C a una velocidad de 3 °C/min, y desde 120 °C a 230 °C a 10 °C/min. Finalmente entre 230 y 250°C, la velocidad de calentamiento fue de 20 °C/min. Esta temperatura se mantuvo durante 5 min. Como gas carrier se utilizó helio (1 ml/min). La temperatura del inyector fue de 220 °C.

El cromatógrafo gaseoso estaba acoplado en línea a un detector de masa cuadrupolar Agilent 5973 para la detección e identificación de los compuestos volátiles. La detección por espectrometría de masa se basa en la ionización del analito (en la cámara de ionización) por el bombardeo de un haz de electrones de alta energía (70 eV). Los iones formados en dicha cámara se extraen de ésta por medio de una serie de electrodos, que permiten colimar (enfocar) y acelerar el haz iónico, y dirigirlo al analizador de masas en donde se clasifican de acuerdo a sus relaciones masa/carga (m/z). Existen varios tipos de analizadores de masas que se usan en los equipos GC-MS. Entre los más frecuentes figuran el cuadrupolo y la trampa de iones. En el analizador de masa cuadrupolar utilizado en este trabajo, los iones generados durante el proceso de ionización, ingresan al espacio entre las cuatro barras metálicas que conforman el cuadrupolo. Los iones de diferentes m/z se separan aplicando un campo eléctrico

y un campo de radiofrecuencia. Los iones adquieren una trayectoria oscilatoria muy compleja y sólo aquellos iones cuya frecuencia es resonante (coincidente) con la del cuadrupolo, podrán atravesarlo. Cuando los iones con la masa específica (m/z) entran “en resonancia” alcanzan a conservar su trayectoria estable (recta) y a cruzar el espacio cuadrupolar y llegan al detector. La señal obtenida para cada fragmento es digitalizada, y con los datos se construye un espectro en el que se grafica la intensidad de la señal en función del de la relación m/z de cada fragmento (Skoog y col., 2008; Stashenko y Martínez, 2010; Ragone, 2015). A modo de ejemplo se muestra el espectro de masa obtenido para el 2-metilhexano (Figura 4.5). En el gráfico se puede observar la intensidad relativa de los picos de masas respecto a su relación masa-carga. El pico más alto de cada espectro se considera el pico base y se le otorga el valor arbitrario de 100 unidades de absorbancia relativa. Se considera que la altura del resto de los

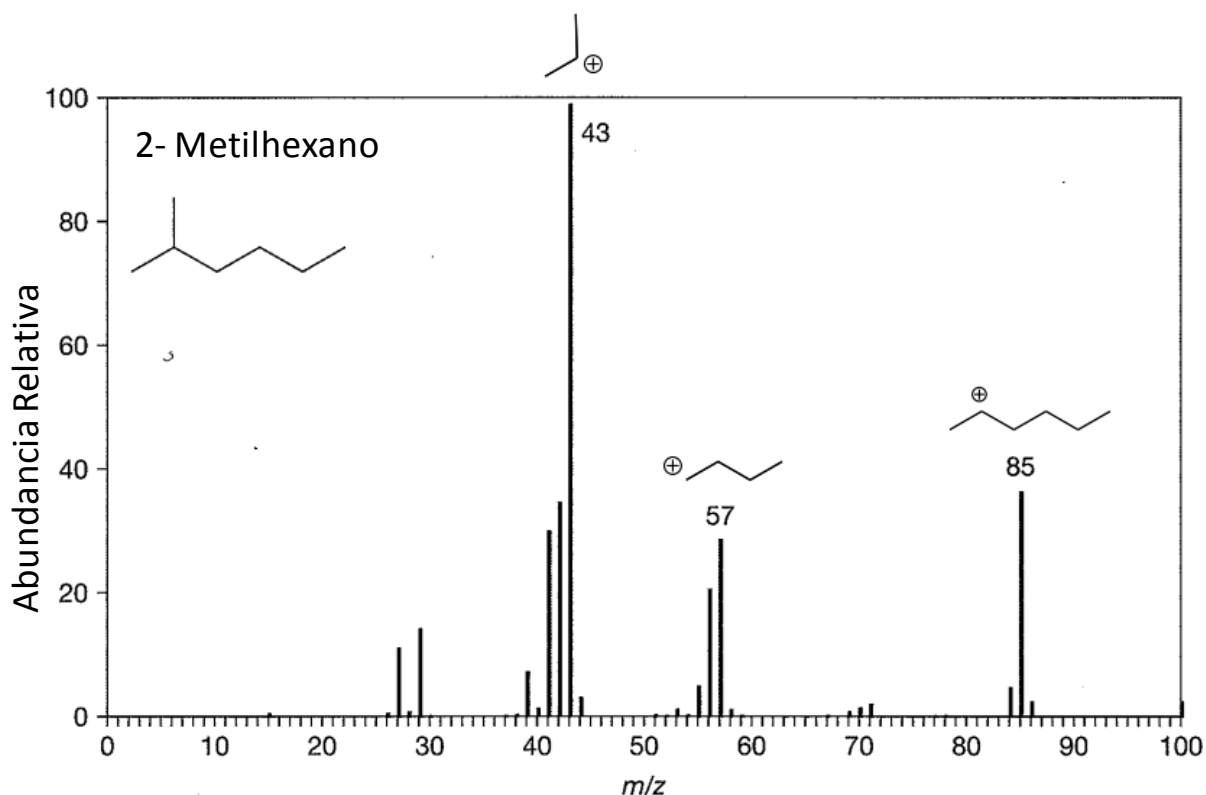


Figura 4.5. Espectro de masa del 2-metilhexano (Adaptado de <https://catalyst.uw.edu...>)

picos es un porcentaje de la altura del pico base (Skoog y col., 2008).

En el presente trabajo, para la detección y caracterización de los compuestos volátiles extraídos de la miel se utilizaron las siguientes condiciones para el detector de masa:

Temperatura de la línea de transferencia (último tramo de la columna del CG, antes de ingresar al detector de masas): 280°C

Temperatura de la fuente de ionización: 230°C

Temperatura del analizador cuadrupolar: 150°C

Los análisis se realizaron por impacto electrónico (potencial de aceleración de 70 eV). La disposición en línea de los equipos utilizados se puede ver en la Figura 4.6.

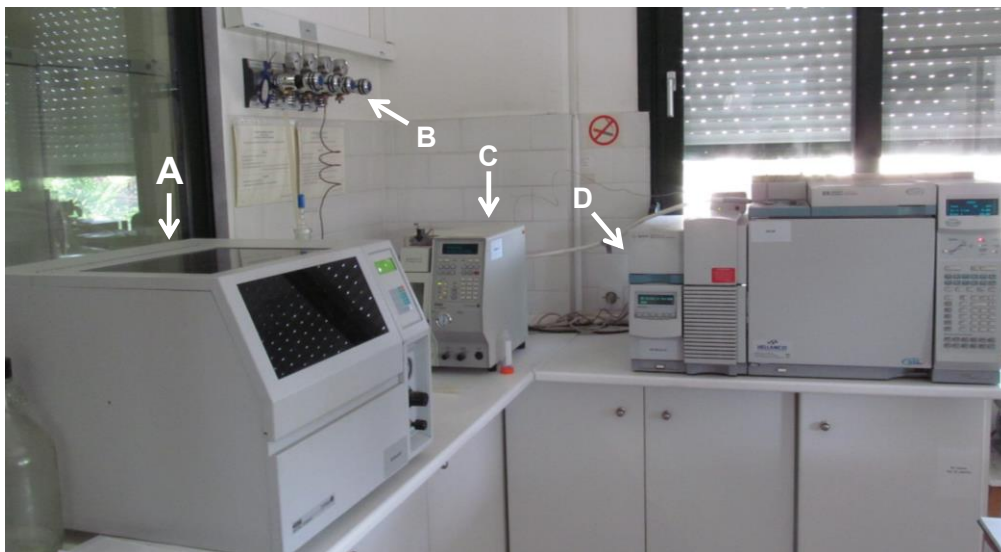


Figura 4.6. Equipos utilizados para la determinación de compuestos volátiles. En la imagen se puede ver el inyector automático OI analytical 4500 (A) junto con las válvulas para controlar el ingreso de gases (B). Se puede observar también el Sample Concentrator OI Analytical 4560 (C) que recibe los compuestos volátiles hasta que son desorbidos de la resina que contiene y llegan al cromatógrafo gaseoso acoplado a un detector de masa (D). Los cromatogramas obtenidos fueron luego analizados en una computadora ubicada a la izquierda del inyector automático (no se observa en la imagen).

Para cada una de las muestras se obtuvieron los cromatogramas de abundancia relativa de la señal medida vs. el tiempo de retención de cada uno de los analitos. Sobre éstos se realizó la identificación de los compuestos volátiles comparando los espectros de GC-MS obtenidos de cada compuesto, con los pertenecientes a la base de datos del equipo (biblioteca NIST, National Institute of Standards and Technology, 2002) o a bibliotecas personales (Tananaki, 2006).

Se calcularon las áreas de cada uno de los compuestos y los resultados se expresaron en función del área obtenida para el patrón interno (estireno).

A modo de ejemplo en la Figura 4.7 se puede ver uno de los cromatogramas obtenidos para una muestra con sus picos ya identificados mediante el detector de masa.

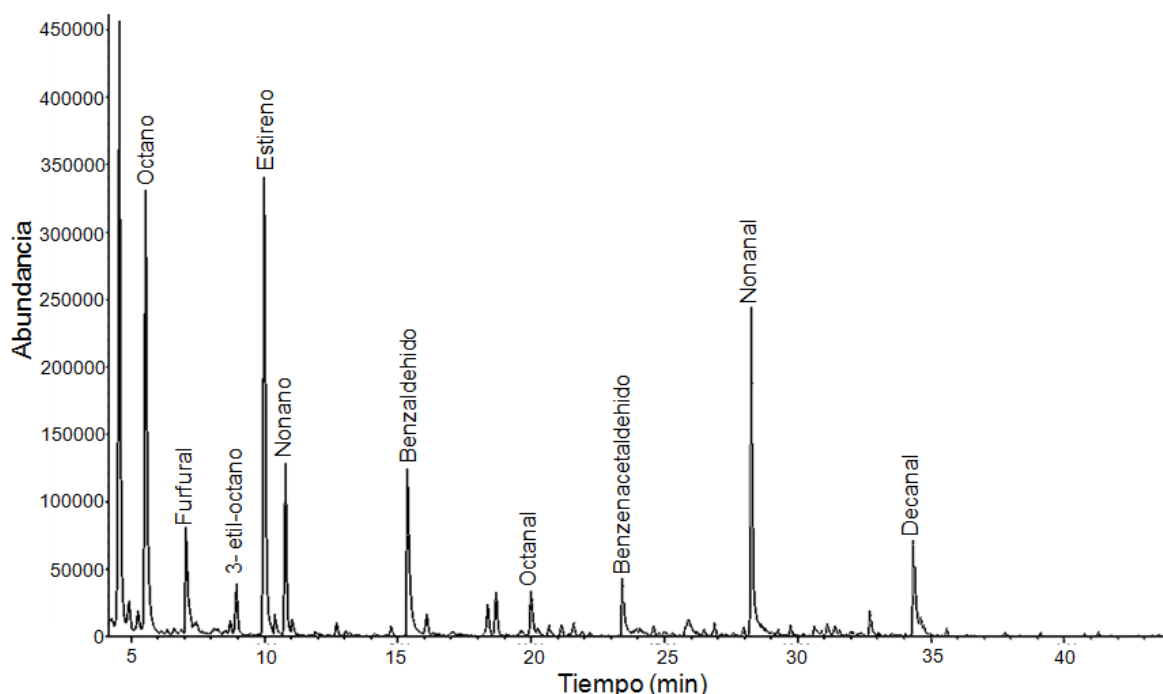


Figura 4.7. Cromatograma de una muestra de miel de la región Paranaense de la provincia de Buenos Aires con los nombres de los compuestos mayoritarios

4.3.2.7 Determinación de capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos

- Preparación de las muestras

Para la determinación de la capacidad antioxidante, se pesaron 10,0000 g de miel, se disolvieron con agua destilada y se llevaron a un volumen final de 25 ml en matraz aforado. La concentración final de la muestra fue 0,4 % p/v.

- Contenido de fenoles totales (CFT)

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para determinar el contenido de fenoles en las muestras de miel. Se agregó agua destilada (2300 µl) y 50 µl del reactivo de Folin a 50 µl de la muestra de miel 0,4 % p/v. Se mezcló por agitación y 2 min después se agregaron 100 µl de Na_2CO_3 20 % en NaOH 0,1 M. La mezcla se dejó reposar durante una hora en oscuridad. Pasado ese tiempo, se midió la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro Hitachi U-1900, Tokio, Japón (Escuredo y col., 2011). Paralelamente se realizó una curva patrón con ácido gálico (250 µg/ml). Los resultados se expresaron como µg de ácido gálico/g de miel. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

- Ensayos de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las mieles se cuantificó mediante el ensayo de DPPH, FRAP y ABTS, tal como se describe en la sección 3.3.3.5 con pequeñas modificaciones que se resumen a continuación.

La capacidad de captación de radicales libres en mieles se determinó por medio del ensayo de DPPH. Se colocaron 0,025 ml de la muestra de miel (0,4 % p/v) y 1,475 ml de una solución de DPPH (30 ppm en etanol) recién preparada. Luego de 30 min se determinó la absorbancia a 515 nm. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Trolox/g}$ de miel. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada muestra.

Para la determinación de FRAP se colocaron 100 μL de la muestra de miel (0,4 % p/v) o su respectiva dilución y se agregaron 0,9 ml de reactivo de FRAP recién preparado. Se determinó la absorbancia a 593 nm una vez estabilizada la absorbancia. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Trolox/g}$ de miel. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

Para el ensayo de ABTS se colocaron 12 μL de la muestra de miel (0,4 % p/v) y 1 ml de solución de ABTS recién preparada, y se determinó la absorbancia a 734 nm a los 6 min de iniciada la reacción. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Trolox/g}$ de miel. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

4.3.2.8 Análisis palinológico

El origen floral de las mieles se determinó a partir de un análisis melisopalinológico. Para caracterizar una miel como monofloral se consideró la presencia de un tipo de polen dominante, que se encuentre en cantidades superiores al 45 % del contenido total de polen. En el caso del eucaliptus, debido a que su polen está sobrerrepresentado, se consideró un porcentaje superior al 70 %. Este análisis fue realizado por la Dra. Guillermina Fagúndez en el laboratorio de Actuopalinología del Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICyTTP-CONICET) (Diamante, Entre Ríos) de acuerdo a la técnica de Louveaux y col. (1978).

4.3.3. Desarrollo de un relleno de galletitas con miel

4.3.3.1 Diseño de mezclas

Para reemplazar parcialmente el azúcar refinado y la fase grasa (en este caso manteca de cacao) por miel en rellenos dulces de galletitas se utilizó un diseño de mezclas de 3 componentes.

El diseño de mezclas es un tipo especial de superficie de respuesta en donde los factores son los ingredientes o los componentes de una mezcla, y la respuesta depende de la proporción de cada uno de estos factores. Además, en este diseño el nivel de cada uno de los factores no puede definirse independientemente, sino que cada uno depende de los otros (Myers y col., 2009).

En este tipo de diseño se cumple que, en una mezcla de q ingredientes, si x_i representa la proporción del i ésimo componente de la mezcla:

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_q = 1 \quad \text{Ec. 4.2}$$

Donde: $i = 1, 2, \dots, q$ y $0 \leq x \leq 1$

De acuerdo a esta ecuación los niveles de cada factor x_i deben ser dependientes entre sí. En un diseño de 3 componentes como éste, el espacio de trabajo es un triángulo, en donde se representan los puntos de la mezcla.

Para este diseño muchas veces se incluyen límites superiores o inferiores. Estos límites se fijan porque se requiere una cantidad mínima de este ingrediente en la mezcla, o porque el contenido de un ingrediente no puede exceder alguna cantidad determinada (Myers y col., 2009).

- Región de operatividad del modelo

Se empleó la formulación obtenida por Battaiotto y col. (2013) como formulación base de los rellenos dulces. Estos autores desarrollaron un relleno similar a los que se pueden encontrar en el mercado, a partir de una formulación que contenía 23,16 % de almidón de maíz, 46,84 % de azúcar impalpable, 0,87 % de solución de gelatina (5 g de gelatina / 55 g de agua) y 29,13 % de manteca de cacao. Esta formulación fue levemente modificada: se le incorporó fibra de avena como prebiótico, y se reemplazó la gelatina por goma xántica.

Se fijó el contenido de almidón (20 g/100 g), fibra de avena (3 g/100 g) y goma xántica (1 g/100 g). Luego se propuso definir los límites de los ingredientes restantes (miel, manteca de cacao y azúcar) de manera tal que su sumatoria completara el 100 % de la formulación.

Capítulo 4 Mieles y Rellenos

Para fijar los límites de los ingredientes, se consideró que el contenido mínimo de manteca de cacao debía ser superior a cero, ya que al fundirse aportaba el medio líquido para homogenizar los ingredientes. Mediante ensayos preliminares se concluyó que el mínimo contenido de manteca de cacao que podría tener el producto era del 10 %.

Teniendo en cuenta estos parámetros de formulación, la región de operatividad del modelo se definió a partir de las siguientes restricciones:

- La suma del contenido de miel, manteca de cacao y azúcar debía ser igual a 76 % (g/100 g de formulación)
- El contenido de miel y azúcar se podría variar desde 0 % a 46 %
- El contenido de manteca de cacao podría variar entre 10 y 30 %

Se utilizó el software estadístico Expert Design (trial versión 7.1.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE.UU) para desarrollar un diseño experimental con 13 puntos, que correspondían a 12 formulaciones ensayadas (con duplicado del punto central), considerando las restricciones anteriormente mencionadas. El relleno sin miel, cuya formulación correspondía a la publicada por Battaiotto y col (2013), se consideró como una formulación “control” (formulación 5). El punto central del diseño que contenía 28 % de miel, 28 % de azúcar y 20 % de manteca de cacao fue realizado por duplicado (formulaciones 10 y 13).

Los parámetros fueron codificados de manera tal de cumplir la ecuación 4.2. El diseño obtenido se puede ver en la Tabla 4.2., mientras que en la Figura 4.8 se puede ver la distribución espacial de los puntos.

Tabla 4.2. Valores porcentuales y codificados de miel, azúcar y manteca de cacao en las diferentes formulaciones ensayadas.

Formulación	Valores porcentuales (%)			Valores codificados		
	Miel	Azúcar impalpable	Manteca de cacao	Miel	Azúcar impalpable	Manteca de cacao
1	20	46	10	0,26	0,61	0,13
2	23	23	30	0,30	0,30	0,39
3	10	46	20	0,13	0,61	0,26
4	46	0	30	0,61	0,00	0,39
5	0	46	30	0,00	0,61	0,39
6	46	20	10	0,61	0,26	0,13
7	33	33	10	0,43	0,43	0,13
8	37	14	25	0,49	0,18	0,33
9	19	37	20	0,25	0,49	0,26
10	28	28	20	0,37	0,37	0,26
11	46	10	20	0,61	0,13	0,26
12	37	24	15	0,49	0,32	0,20
13	28	28	20	0,37	0,37	0,26

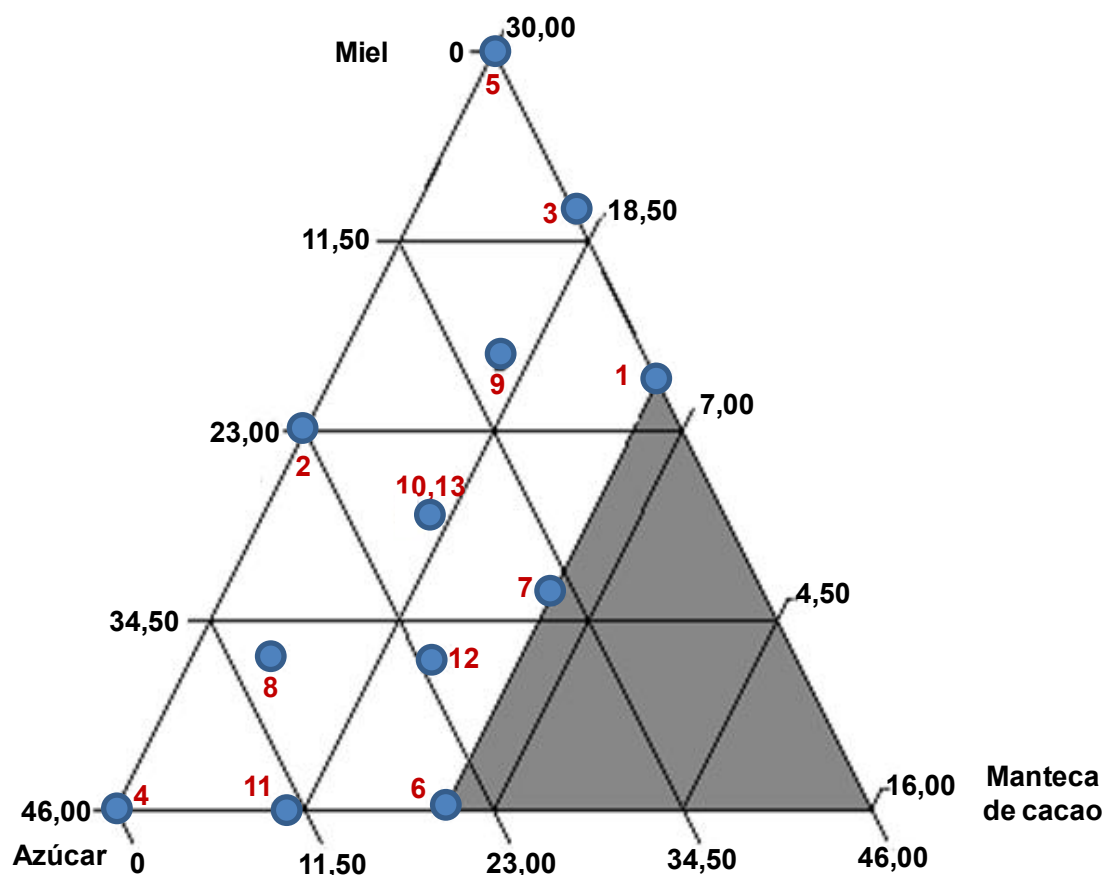


Figura 4.8. Distribución espacial de las formulaciones analizadas de acuerdo al diseño de mezclas

4.3.3.2 Elaboración y caracterización de los rellenos

Como se mencionó en la sección anterior, todas las formulaciones ensayadas contenían almidón (20 g/100 g), fibra de avena (3 g/100 g) y goma xántica (1 g/100 g). Para cada una de las formulaciones los contenidos de manteca de cacao, azúcar impalpable y miel fueron los indicados en la Tabla 4.2.

Para la elaboración de los rellenos se fundió la manteca de cacao en un baño termostático a 45 °C. La miel y la mezcla de ingredientes secos constituida por fibra de avena, azúcar impalpable, goma xántica y almidón de maíz fueron pesados previamente y agregados a la manteca fundida, mezclando manualmente hasta obtener una pasta homogénea. Los rellenos se dejaron enfriar a temperatura ambiente (20 °C) durante 15 min y fueron luego cortados en discos de 30 mm de diámetro × 20 mm de espesor.

- Textura de los rellenos

La textura es un atributo esencial en rellenos de galletitas. El producto debe poseer un delicado equilibrio entre cada uno de sus parámetros para que el mismo sea aceptado y pueda ser manipulable durante su fabricación. Se analizaron 5 parámetros de textura en los rellenos seleccionados: dureza, cohesividad, adhesividad, tiempo de relajación y elasticidad. Estos parámetros fueron los considerados por Battaiotto y col. (2013) para la optimización de una formulación de rellenos dulces de galletitas.

Sobre los rellenos recién preparados se realizó el análisis de perfil de textura (TPA) (Bourne, 1978) utilizando un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Inglaterra). Se colocó el relleno en el plato inferior del equipo y se lo sometió a un ciclo de doble compresión con una deformación del 20 %, utilizando una sonda de aluminio SMS/75 (de 7,5 cm de diámetro) y una celda de 25 kg. La velocidad de la sonda fue de 2,0 mm/s. El tiempo entre ambos ciclos fue de 5 s. Se registró la fuerza (N), en función del tiempo (s), obteniéndose un gráfico como el de la Figura 4.9, del cual se obtuvieron siguientes parámetros (Bourne, 1978):

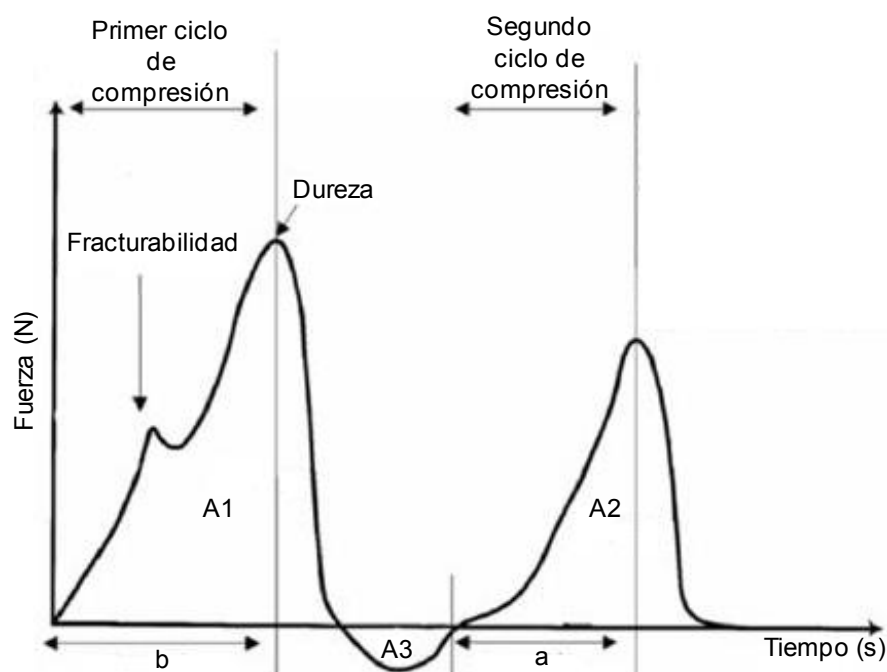


Figura 4.9. Curva general de un análisis de perfil de textura (Adaptado de Hleap y Velasco, 2010)

- Dureza o firmeza: Es la fuerza máxima obtenida en el primer ciclo de compresión. Se expresa en Newtons (N)
- Cohesividad: Parámetro adimensional que se calcula como el cociente entre el área de la segunda compresión (A2) y el área de la primera compresión (A1).
- Adhesividad: Es el área del pico negativo después del primer ciclo de compresión (A3). Sus unidades son N x s.

Para determinar la elasticidad y el tiempo de relajación, los discos de relleno fueron sometidos a un ensayo de relajación: se comprimieron hasta un 20 % de su altura y se mantuvieron así durante 20 min, o el tiempo necesario para que la fuerza se mantenga constante.

Sobre los gráficos de fuerza (N) vs tiempo (s) se determinaron los siguientes parámetros: fuerza máxima (F_0) y fuerza a los 20 min F_{20} , tal como se puede observar en la Figura 4.10.

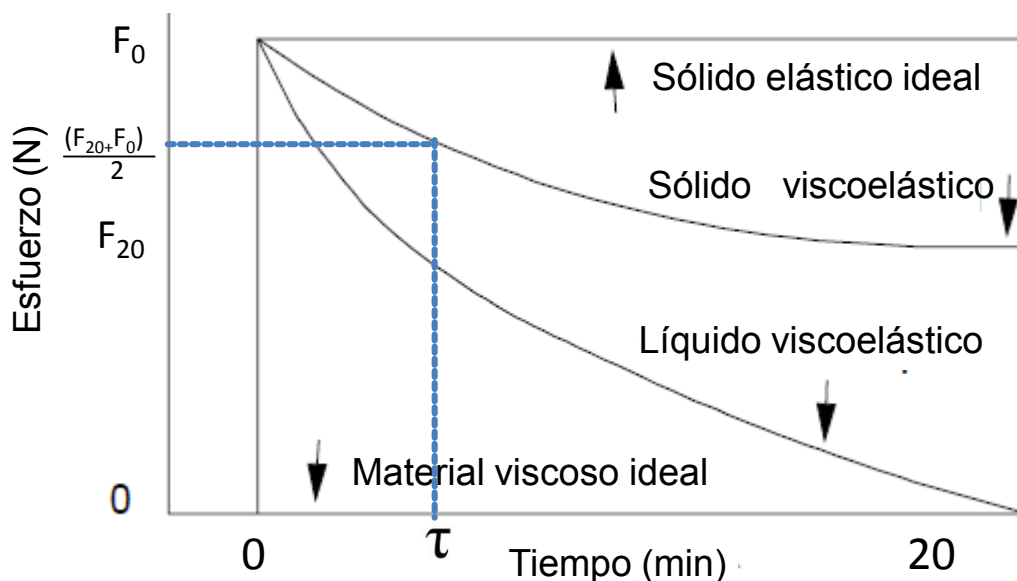


Figura 4.10. Curvas de relajación de diferentes materiales y cálculo del tiempo de relajación para un sólido viscoelástico considerando una deformación instantánea (Adaptado de Steffe, 1996).

A partir de estos parámetros se determinó el tiempo de relajación (τ) (Peleg, 1979) como el tiempo en el que se cumple que:

$$F = \frac{F_{20} + F_0}{2} \quad \text{Ec. 4.3}$$

El tiempo de relajación es una medida representativa de la velocidad de relajación del material: cuanto mayor es el valor de este parámetro es menor la velocidad de relajación del material.

La elasticidad de los rellenos se determinó como:

$$\text{Elasticidad} = \frac{F_{20}}{F_0} \quad \text{Ec. 4.4}$$

Todas las medidas de textura se realizaron al menos por cuadruplicado.

- Actividad acuosa

La actividad acuosa se determinó por duplicado sobre cada formulación, tal como se describió en el capítulo 3 (sección 3.3.2.3).

- Capacidad antioxidante de los rellenos

Para la determinación de la capacidad antioxidante, las muestras fueron congeladas y liofilizadas en un equipo LabEquipment (Denmark) durante 48 horas, posteriormente fueron reducidas a un fino polvo con un mortero manual. Luego se midió la capacidad antioxidante total de los rellenos por dos métodos distintos: DPPH y FRAP.

Las determinaciones se realizaron sobre el sólido, de acuerdo la técnica de *Quencher* descrita por Sepen y col. (2007), a fin de considerar la totalidad de los componentes con capacidad antioxidante en el alimento (capítulo 3, sección 3.3.3.5).

Sobre $0,040 \pm 0,001$ g de relleno se agregaron 1,5 ml de reactivo DPPH (30 ppm en etanol), y se dejó la mezcla de reacción en agitación en oscuridad durante una hora. Luego se centrifugaron las muestras 10 min a $10000 \times g$. Se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 515 nm.

De modo similar, se pesaron $0,040 \pm 0,001$ g de las muestras de relleno liofilizadas y se agregaron 1,8 ml del reactivo de trabajo de FRAP recién preparado y 0,2 ml de agua destilada. Se agitó la mezcla de reacción por 90 min a 1100 rpm. Pasado ese tiempo las muestras se centrifugaron a $10000 \times g$ por 10 min y se determinó la absorbancia a 593 nm.

Para ambos ensayos, los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Trolox/g}$ de muestra seca. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado para cada formulación.

4.3.3.3 Obtención de superficies de respuesta

La metodología de Superficie de Respuesta es un modelado matemático que permite visualizar la respuesta de la variable de interés en función de los distintos factores experimentales. Esta herramienta permite probar el efecto de múltiples variables, sus interacciones y la sensibilidad de la respuesta a estas variables (Myers y col., 2009).

Para la aplicación de la superficie de respuesta las variables fueron codificadas (tal como se puede ver en la Tabla 4.2) de manera tal que la sumatoria de todas las proporciones sea igual a 1 (ecuación 4.2). La respuesta (\hat{Y}) en función del factor (x) se determinó mediante un modelo polinómico del tipo:

$$\hat{Y} = \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{\substack{i,j \\ i \neq j}}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{\substack{i,j \\ i \neq j}}^k \beta_{ii} x_i (x_i x_j) + \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad \text{Ec. 4.5}$$

En este modelo \hat{Y} es la variable respuesta, x corresponde al contenido de cada componente como una variable codificada, β_i , β_{ij} y β_{ijk} representan los coeficientes de la regresión (de primer orden, doble e interacciones más complejas) mientras que i , j y k representan a cada componente de la mezcla (en este caso miel, manteca de cacao y azúcar impalpable). Al utilizar las variables codificadas, la magnitud de los coeficientes del modelo indica la importancia de cada factor (Myers y col., 2009).

Los coeficientes se evaluaron utilizando el software Expert Design (trial version 7.1.6, Stat Ease Inc., Minneapolis, EE.UU). Para obtener los términos significativos de los polinomios se realizó una metodología de eliminación “paso a paso”. Para el diseño, sólo se consideraron aquellos que resultaron significativos sobre la respuesta observada ($P \leq 0,05$).

La adecuación del modelo se verificó por medio de un test de falta de ajuste (“lack of fit”) y del coeficiente de precisión adecuada (“adequate precision”). El coeficiente “falta de ajuste” indica la variación de los datos alrededor del modelo ajustado; si el modelo no se ajusta correctamente a los datos experimentales, este coeficiente será significativo. Análogamente, un coeficiente de “falta de ajuste” no significativo, indica que los datos se ajustan adecuadamente al modelo. El parámetro “precisión adecuada” es una relación de la señal y el ruido. Compara el rango de los valores previstos en los puntos de diseño al error medio de predicción. Valores mayores a 4 indican que el modelo es adecuado (Design Expert, 2005; Marchetti, 2014).

Luego de ajustar los modelos, se llevó a cabo un análisis de los residuos para validar las hipótesis en los ANAVA (se evaluó que los errores estuvieran normalmente distribuidos y con varianzas homogéneas).

En los casos en los que los parámetros no hayan podido ser ajustados a modelos matemáticos, los resultados fueron analizados de acuerdo a un análisis de varianza (ANAVA). Para comparar entre medias se utilizó el test de “mínimas diferencias significativas” (LSD). En todos los casos, el nivel de significación elegido fue del 95 %.

4.3.3.4 Optimización y validación del modelo

El objetivo de la optimización es definir los niveles de los factores que generan la respuesta deseada (Meyers y col., 2009). Como la calidad de un producto depende de múltiples variables, para la optimización deben considerarse todas ellas para mantenerlas dentro de límites deseables. Por esto, se utilizó una optimización multi respuesta para predecir la formulación óptima, y se empleó una metodología de “función objetivo o conveniencia”, d. Para esto es necesario convertir cada respuesta (\hat{Y}_j) en la correspondiente función deseabilidad (d_j) que puede tomar valores entre 0 y 1: si $d_j(\hat{Y}_j) = 0$ resulta un valor de respuesta completamente indeseable, mientras que si $d_j(\hat{Y}_j) = 1$, indica que la respuesta obtenida es

completamente deseable (Marchetti y col., 2015). Dependiendo de si la respuesta va a ser maximizada, minimizada o se le asignará un valor objetivo determinado, se deben emplear distintas funciones objetivo $d_j(Y_j)$ (Meyers y col., 2009; Marchetti y col., 2014):

Si la variable respuesta debe maximizarse, la función de deseabilidad se define por la siguiente ecuación:

$$d_j = \begin{cases} 0 & ; Y_{jMin} \geq \hat{Y}_j \\ \frac{(\hat{Y}_j - Y_{jMin})}{(Y_{jMax} - Y_{jMin})} & ; Y_{jMin} < \hat{Y}_j < Y_{jMax} \\ 1 & ; \hat{Y}_j = Y_{jMax} \end{cases} \quad \text{Ec. 4.6}$$

Si la variable respuesta debe minimizarse, la función de deseabilidad es definida por

$$d_j = \begin{cases} 1 & ; Y_{jMin} = \hat{Y}_j \\ \frac{(\hat{Y}_j - Y_{jMax})}{(Y_{jMin} - Y_{jMax})} & ; Y_{jMin} < \hat{Y}_j < Y_{jMax} \\ 0 & ; \hat{Y}_j \geq Y_{jMax} \end{cases} \quad \text{Ec. 4.7}$$

Si la variable respuesta debe mantenerse en un valor objetivo, la función de deseabilidad queda definida por:

$$d_j = \begin{cases} 0 & ; Y_{jMin} > \hat{Y}_j \\ \frac{(\hat{Y}_j - Y_{jMin})}{(Y_{jobj} - Y_{jMin})} & ; Y_{jMin} \leq \hat{Y}_j \leq Y_{jobj} \\ \frac{(\hat{Y}_j - Y_{jMax})}{(Y_{jobj} - Y_{jMax})} & ; Y_{jobj} \leq \hat{Y}_j \leq Y_{jMax} \\ 0 & ; \hat{Y}_j > Y_{jMax} \end{cases} \quad \text{Ec. 4.8}$$

Donde:

\hat{Y}_j = respuesta predicha por el modelo

Y_{jMax} = valor máximo aceptado para la variable respuesta \hat{Y}_j

Y_{jMin} = valor mínimo aceptado para la respuesta \hat{Y}_j

Y_{jObj} = valor deseado para la respuesta \hat{Y}_j

Luego, para combinar las deseabilidades de todas las respuestas, se crea una sola función compuesta D de deseabilidad (Statpoint, 2006). En el presente trabajo, esta función fue definida como la media geométrica de las n deseabilidades individuales para cada parámetro, según la ecuación:

$$D = \sqrt[n]{d_1 * d_2 * d_3 * ... * d_n} \quad \text{Ec 4.9}$$

A partir de la maximización de esta función, se pueden obtener los valores óptimos de cada factor (en este caso: contenido de manteca de cacao, miel y azúcar).

Para la optimización de la formulación de rellenos dulces se consideraron las variables relacionadas con aspectos de calidad del producto, minimizando el contenido de manteca y azúcar y maximizando el contenido de miel. A partir de los resultados obtenidos por Battaiotto y col. (2013) se buscó que el producto final presentara la máxima adhesividad, cohesividad, tiempo de relajación y firmeza. También se optimizó la formulación de manera tal que presentara un valor objetivo de 0,227 unidades de elasticidad (este valor fue considerando por Battaiotto y col., 2013 como el valor óptimo de elasticidad que debían presentar los rellenos de galletitas para que su textura fuera similar a la de los rellenos comerciales).

Una vez obtenida la formulación optimizada se preparó un relleno que respetara las proporciones. Luego se analizaron todas las variables de respuesta obtenidas sobre el producto recién preparado y se las comparó con los valores predichos por el modelo. Para comprobar si los valores experimentales obtenidos eran estadísticamente diferentes a los predichos se utilizó una prueba T de student para una muestra, que permite contrastar si la media de una población difiere significativamente de un valor dado. De esta manera se comprobó si existían o no diferencias significativas entre la variable predicha y la respuesta obtenida con un nivel de confianza del 95 % (Balzarini y col., 2008).

4.3.4 Vida útil de rellenos

A partir de la formulación optimizada, se prepararon rellenos con miel que se envasaron individualmente en bolsas de polipropileno selladas al vacío tal como se describe en el capítulo 3 (sección 3.3.2.2). Paralelamente se utilizó un relleno sin miel como control. La composición de este relleno correspondía a la formulación 5 de la Tabla 4.2.

Los rellenos fueron conservados durante 6 meses a 20 °C. Cada 4-5 semanas tiempo se tomaron dos muestras de cada uno de los rellenos, sobre las que se realizaron los ensayos descritos en las secciones siguientes.

4.3.4.1 Oxidación lipídica en rellenos

El nivel de oxidación lipídica de los rellenos se determinó tal como se detalla en el capítulo 3 sección 3.3.2.7.

4.3.4.2 Humedad y actividad acuosa

La actividad acuosa se determinó tal como se describe en la sección 3.3.2.3. El contenido de humedad de las muestras se determinó por diferencia de peso antes y después del proceso de liofilización utilizando la ecuación detallada en la sección 3.3.2.4 (Masson, 1997).

4.3.4.3 Estabilidad de los antioxidantes durante el tiempo de conservación

Durante el tiempo de conservación se tomaron muestras de los rellenos y se determinó su capacidad antioxidante tal como se describe en la sección 4.3.3.2.

4.3.4.4 Textura de rellenos

Se determinó la dureza, cohesividad, adhesividad, tiempo de relajación y elasticidad de los rellenos con miel y control luego de los 6 meses de conservación a 20 °C. Los valores de estos parámetros se compararon con los valores obtenidos en los rellenos recién preparados.

4.3.4.5 Recuento microbiano

Finalizado el tiempo de conservación, se evaluó la carga microbiana de los rellenos control y con miel. Para esto se tomaron 10 g de cada relleno y se homogeneizaron con 90 ml de agua peptonada (0,1 %) utilizando un equipo estomacher (Seward Laboratory Blender, Stomacher 400, UK). Una vez obtenida la suspensión inicial se realizaron diluciones con agua

peptona, sobre las que se realizó un recuento de microorganismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras, y coliformes totales.

Para la determinación de microorganismos mesófilos aerobios se sembró 1 ml de las diluciones 1:10; 1:100 y 1:1000 en agar PCA (capítulo 3, sección 3.3.4.4). Las muestras se incubaron durante 48 hs a 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación se hicieron los recuentos sobre las placas cuya dilución presentara un recuento entre 30 y 300 colonias. Se informó el contenido de microorganismos como log Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/g de relleno.

Para la cuantificación de hongos y levaduras se utilizó un agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC), que contiene extracto de levadura en polvo (5 g/L); glucosa (20 g/L), agar-agar (15 g/L) y cloranfenicol (0,1 g/L). Este último inhibe el crecimiento de bacterias presentes en la muestra (Merck, 2016). Para la determinación se sembró 0,1 ml de las diluciones 1:10; 1:100 y 1:1000 en agar YGC. Las placas se incubaron por 5 días a 20 °C. (ANMAT, 2014). Una vez finalizado el tiempo de incubación se contabilizó el número de colonias de mohos y el de levaduras para informar el recuento en log UFC/g de relleno (ANMAT, 2014). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

La determinación de coliformes totales se realizó mediante la técnica del Número Más Probable (NMP). Esta técnica aprovecha ciertas características de las bacterias coliformes para su rápida detección (capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas en presencia de sales biliares). Este método utiliza Caldo Mc Conkey, que contiene peptona (20 g/L) como fuente de aminoácidos y de otros factores de crecimiento, lactosa (20 g/L) como hidrato de carbono fermentable, bilis de buey (5 g/L) que estimula el crecimiento de las bacterias coliformes e inhibe a gran parte de la flora gram positiva, y púrpura de bromocresol (0,01 g/L) como indicador de pH (Lab Britania, 2015^b). Se prepararon 3 series de 3 tubos cada una con una campana de Durham y 10 ml de caldo Mc Conkey. En cada uno de los tubos de la primera serie se vertió 1 ml de la dilución de la muestra 1:10, en la segunda serie se vertió 1 ml de la dilución 1:100 y en la última serie 1 ml de la dilución 1:1000. Las tres series se incubaron a 37 °C y se tomaron lecturas a las 24 y 48 hs. Se consideró que había reacción positiva al observarse desprendimiento de gas en la campana y formación de ácido (viraje del indicador de violeta a amarillo). Luego, mediante tablas, se infirió el NMP por cada 100 g de relleno (Anderson y Calderón, 1999).

4.3.5. Análisis estadístico

A menos que haya sido especificado previamente, los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANAVA) monofactorial o bifactorial según correspondiera. Para comparar entre medias se utilizó el test de “mínimas diferencias significativas” (LSD). Si en cambio, la comparación se realizó sólo entre dos muestras se utilizó una prueba T de Student bilateral para muestras independientes (Balzarini y col., 2008).

En todos los casos, el nivel de significación elegido fue del 95 %.

Para evaluar la relación entre las variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson descripto en la sección 3.3.6.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Selección de miel

Para la selección de la miel más apta para los rellenos se recolectaron mieles directamente de productores de distintas regiones de las provincias de Buenos Aires (región Talar, Pampeana Oriental y Paranaense), Río Negro y Chubut (Región Patagonia Andina). Las muestras fueron clasificadas por región, y se determinaron parámetros relacionados con su calidad y frescura (humedad, HMF y actividad diastasa). Se evaluó el perfil de compuestos volátiles de las mieles, se determinó la capacidad antioxidante mediante distintas técnicas y se evaluaron la relación entre parámetros posiblemente asociados con el contenido de compuestos antioxidantes (color, conductividad y contenido de fenoles totales).

4.4.1.1 Humedad, hidroximetilfurfural (HMF) y actividad diastasa

La humedad de la miel se considera un parámetro muy importante para asegurar el tiempo de vida útil del producto. La determinación se realiza generalmente por refractometría, que es un método simple y reproducible. La humedad de la miel puede estar influenciada por distintos factores, entre ellos, la composición de azúcares, la temperatura y la humedad ambiente. Los distintos azúcares de la miel tienen la propiedad de absorber y retener agua de manera distinta, por ejemplo la fructosa es más higroscópica que el resto de los azúcares (Baldi, 1998). Si una miel con un contenido de humedad de menos de 18,3 % se deja expuesta en un ambiente con una humedad de más del 60 %, la miel absorberá agua, que formará una capa líquida en la superficie favoreciendo el crecimiento de microorganismos (Baldi, 1998). Sin embargo, como se explicó anteriormente, no es el contenido de agua, sino la a_w lo que define el tipo de microorganismos que se pueden encontrar en los alimentos. Considerando esto, muchos trabajos se han enfocado en encontrar correlaciones entre el contenido de humedad de las mieles y la actividad acuosa de las mismas. En mieles argentinas se han encontrado excelentes correlaciones entre la humedad y la actividad acuosa, para contenidos de humedad de miel entre el 13 y el 25 % (Conforti y col. 2006; Chirife y col., 2006). El Código Alimentario Argentino, capítulo X, (CAA, 2010) establece que el contenido máximo de humedad permitido en mieles es del 20 %.

El contenido de HMF y la actividad diastasa se consideran parámetros relacionados con la frescura de la miel e indicadores del tratamiento térmico. Una miel fresca prácticamente no contiene HMF; su contenido aumenta con el tiempo de conservación. Es importante notar que su velocidad de formación depende entre otras cosas de la temperatura ambiente, a mayor temperatura mayor es la velocidad de acumulación del HMF. Es por esto que el Codex

Alimentarius, en su revisión de 1997 fijó un límite de 80 mg/Kg, atendiendo al reclamo de los países subtropicales, cuyas mieles poseen un contenido de HMF más alto por la alta temperatura ambiental. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino, junto con el Mercosur, han mantenido el valor máximo de 40 mg/Kg de HMF en mieles (Baldi, 2010).

La diastasa es una enzima que se produce principalmente en las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras; la actividad de esta enzima en mieles es variable y depende de la temperatura, el tiempo de conservación y el origen floral de la miel. Mieles cítricas poseen baja actividad (situación considerada en la normativa), mientras que en general las mieles de mielada presentan actividades superiores a las de las mieles florales. Como la actividad de esta enzima disminuye por el tratamiento térmico o un prolongado tiempo de conservación, el Código Alimentario considera que su valor mínimo en escala de Gothe debe ser de 8 unidades diastasa (UD) (en mieles cítricas se acepta un valor de 3 UD, siempre que el contenido de hidroximetilfurfural no sea mayor de 15 mg/kg) (Artículo X del CAA) (CAA, 2010; Baldi, 2010). Todas las muestras analizadas cumplían con los requerimientos de Código Alimentario Argentino (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Humedad y parámetros de frescura (HMF y actividad diastasa) en muestras de miel

	Humedad (%)	HMF (mg/Kg)	Diastasa (UD)
Patagonia Andina	15,3 ± 0,9 ^a	0,9 ± 0,7 ^a	21,1 ± 5,1 ^a
Buenos Aires, Talar	18,0 ± 1,3 ^b	5,9 ± 2,7 ^a	31,6 ± 3,8 ^b
Buenos Aires, Oriental	17,5 ± 1,0 ^b	15,5 ± 13,1 ^b	23,3 ± 3,5 ^{ab}
Buenos Aires, Paranaense	17,8 ± 0,7 ^b	5,6 ± 2,3 ^a	23,8 ± 8,5 ^{ab}

Los valores informados corresponden a las medias ± las desviaciones estándar. Superíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente (P > 0,05).

El contenido de humedad en todas las mieles analizadas fue inferior al 20 %; según las ecuaciones de Chirife y col. (2006) desarrolladas sobre mieles argentinas, estos valores corresponderían a actividades acuosas menores a 0,62; lo que asegura la inhibición de microorganismos, incluyendo hongos y levaduras. En cambio, mieles cuyo contenido de humedad supera el máximo permitido de 20 % sí pueden presentar valores de actividades acuosas mayores a 0,67 (Conforti y col., 2006). El análisis estadístico mostró que la humedad de las mieles de la región Andina Patagónica era significativamente menor a la del resto de las regiones analizadas (Tabla 4.3). Esto probablemente se relacione a las diferencias climáticas de las distintas regiones. Estos resultados se corresponden con trabajos anteriores de Aloisi (2010), quien analizó el contenido de humedad de mieles de la provincia de Chubut,

encontrando también bajos valores de humedad (alrededor del 15 %). En el mismo sentido, los resultados de Forcone y col., (2009) demostraron que el 97 % de las mieles analizadas provenientes del noroeste de Santa Cruz, presentaban un contenido de humedad menor al 17,5 %; este resultado pudo relacionarse con las características áridas de la región.

Por otro lado, los valores de HMF encontrados para cada una de las regiones resultaron inferiores a 40 mg/Kg. Las mieles de la región Pampeana Oriental presentaron un contenido de HMF significativamente superior a las mieles de las otras regiones; en esta región se encontraron mieles con un contenido de HMF de 33 mg/Kg, similar a los valores máximos encontrados para mieles cosechadas entre los años 1997 y 2000 en toda la provincia de Buenos Aires (Mouteira y col., 2001). Por otro lado, la actividad diastasa medida para todas las muestras fue superior a las 8 UD exigidas por el Código Alimentario Argentino, incluso en muestras que contenían altos niveles de HMF.

4.4.1.2 Conductividad y color de mieles

El color de la miel es muy importante a nivel comercial, ya que define su precio e influye fuertemente en la elección de compra del consumidor. Por ejemplo, en Norteamérica se prefieren mieles claras, mientras que en Europa se optan por mieles más oscuras. La medida del color permite entonces a los exportadores definir el mercado de destino de los productos (Delmoro y col., 2010). De la totalidad de las muestras analizadas, el 42 % presentaron un color ámbar claro, un 23 % presentaron un color blanco, un 19 % un color ámbar, mientras que el restante 15 % correspondía a mieles color ámbar extra claro. Los resultados del color de las mieles clasificadas según su región se pueden ver en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Color y conductividad de muestras de miel

	Color Pfund (mm)	Clasificación	Conductividad (mS/cm)
Patagonia Andina	69 ± 20 ^b	Ámbar claro	0,66 ± 0,27 ^b
Buenos Aires, Talar	58 ± 25 ^b	Ámbar claro	0,38 ± 0,09 ^a
Buenos Aires, Oriental	28 ± 8 ^a	Blanco	0,23 ± 0,09 ^a
Buenos Aires, Paranaense	73 ± 17 ^b	Ámbar claro	0,40 ± 0,06 ^a

Los valores informados corresponden a las medias ± las desviaciones estándar. Superíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente (P > 0,05).

Las mieles de la región Pampeana Oriental de la provincia de Buenos Aires resultaron significativamente más claras que las mieles de las otras regiones, presentando un color “blanco” en promedio, mientras que las mieles recolectadas de otras regiones presentaron un

color “ámbar claro”. Se compararon los valores obtenidos con datos de cosechas anteriores y se encontró que las mieles de las regiones Talar y Parananese, recolectadas en 1999 presentaron valores promedio de color Pfund de 20,6 y 51,1, respectivamente, más claras que las mieles cosechadas en el 2014. Sin embargo, las mieles de la región Oriental parecen haber mantenido su color claro (color Pfund de 24,8 en 1999 y de 28,0 en el 2014). El color en las mieles depende de distintos factores; principalmente se encuentra relacionado con su origen botánico, que depende a su vez de la procedencia geográfica de la miel (Baldi, 1998). Se ha correlacionado el color de la miel con su contenido de minerales (especialmente elementos de transición y calcio) y compuestos fenólicos (González-Miret y col., 2005; Bertonecelj y col., 2007). Además, durante el tiempo de conservación puede ocurrir un oscurecimiento, principalmente por las reacciones de Maillard o por caramelización de los azúcares (Bertonecelj y col., 2007). Por otro lado, se ha observado que las mieles con colores más oscuros presentan un mayor poder antioxidante que las mieles más claras (Wilczyńska, 2014), probablemente debido a los compuestos fenólicos o a los productos de la reacción de Maillard.

La conductividad eléctrica de las mieles de la provincia de Buenos Aires, fue similar a los valores obtenidos en años anteriores (Malacalza y col., 2005). Las mieles de la región Andina presentaron una mayor conductividad eléctrica que las de otras regiones (Tabla 4.4). Estos valores fueron superiores incluso a los valores encontrados en bibliografía en mieles de la región andino patagónica de la provincia de Santa Cruz (Forcone y col., 2009; Aloisi, 2010). Una alta conductividad eléctrica se puede deber a distintos factores, en primer lugar este valor se relaciona habitualmente con el contenido de minerales, ácidos orgánicos y proteínas presentes (Acquarone y col., 2007). Se han encontrado excelentes correlaciones entre este valor y el contenido de cenizas en las mieles (Malacalza y col., 2005; Silva y col., 2009). Además, este parámetro puede presentar gran variabilidad entre mieles de distintos orígenes florales, y puede ser utilizado como una herramienta para diferenciarlas (Malacalza y col., 2005; Silva y col., 2009). En general, se considera que las mieles de origen floral deberían presentar valores de conductividad inferiores a 0,8 mS/cm; en cambio la miel de mielada y la miel de castañas puede presentar valores superiores (Bogdanov, 1999).

4.4.1.3 Contenido de antioxidantes en mieles

La miel es considerada una importante fuente de antioxidantes con numerosas propiedades beneficiosas para la salud (Gheldof y Engeseth, 2002). El consumo de miel podría reducir el estrés oxidativo en el tracto gastrointestinal, el hígado, el páncreas, los riñones, los órganos reproductores y en plasma. Es por esto que se ha señalado a la miel como un eficiente antioxidante para combatir enfermedades relacionadas al estrés oxidativo como la diabetes, la

hipertensión y el cáncer (Erejuwa y col., 2012). La capacidad antioxidante de la miel en muchos casos se ha relacionado con la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (Alvarez-Suarez y col., 2013). Otros autores también han sugerido que la capacidad antioxidante de las mieles podría estar relacionada con el contenido de minerales, ya que podrían actuar como donores de electrones (Chua y col., 2013; Sant'Ana y col., 2012).

Tal como se explicó previamente, por la complejidad de las reacciones de oxidación y los diversos mecanismos de reacción de los antioxidantes, es necesario realizar una combinación de técnicas para obtener resultados confiables en la medida de la capacidad antioxidante (Gheldof y Engeseth, 2002). Entre las muestras de miel analizadas se encontraron diferencias significativas en el contenido de antioxidantes determinado por las técnicas de ABTS, DPPH y FRAP ($P \leq 0,05$). Por otro lado, el ensayo de Folin-Ciocalteu, que se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos (Pastoriza y Rufián-Henares, 2014), también mostró diferencias significativas entre las mieles de distintas zonas ($P \leq 0,05$) (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Contenido de antioxidantes (cuantificado mediante las técnicas de ABTS, DPPH y FRAP) y compuestos fenólicos en mieles argentinas

	Folin (μg gálico/g)	ABTS (μmol Trolox/g)	DPPH (μmol Trolox/g)	FRAP (μmol Trolox/g)
Patagonia Andina	825 ± 167^b	$2,4 \pm 0,8^b$	$1,3 \pm 0,5^b$	$1,6 \pm 0,7^b$
Bs. As. Talar	821 ± 160^b	$1,4 \pm 0,8^a$	$1,1 \pm 0,5^b$	$1,7 \pm 0,6^b$
Bs. As. Oriental	602 ± 72^a	$0,7 \pm 0,4^a$	$0,5 \pm 0,1^a$	$0,8 \pm 0,2^a$
Bs. As. Paranaense	760 ± 152^{ab}	$1,3 \pm 2,0^a$	$0,9 \pm 0,2^{ab}$	$1,4 \pm 0,2^{ab}$

Los valores informados corresponden a las medias \pm las desviaciones estándar. Superíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente ($P > 0,05$).

En general, el mayor contenido de antioxidantes se encontró en las mieles de la región Andino Patagónica. Esta región presentó el mayor contenido de antioxidantes cuantificados por la técnica de ABTS ($P \leq 0,05$). Mediante los ensayos de FRAP y DPPH estas mieles demostraron tener una capacidad antioxidante también alta, pero sin diferenciarse de las mieles de la región del Talar ni Paranaense ($P > 0,05$). Por otro lado, las mieles de la región Pampeana Oriental de Buenos Aires presentaron los menores valores de capacidad antioxidante (Tabla 4.5).

Los valores encontrados de antioxidantes y compuestos fenólicos fueron comparados con los de referencias bibliográficas nacionales e internacionales. El contenido de compuestos fenólicos en las mieles analizadas (recolocadas en el año 2014) resultó similar al obtenido en mieles de la provincia de Buenos Aires cosechadas en años anteriores (Patrignani y col., 2016). Por otro lado, se encontró que el contenido de compuestos fenólicos fue superior al obtenido

por Beretta y col. (2005) en mieles multiflorales de Italia, pero similares (e incluso levemente inferiores) a los obtenidos en mieles portuguesas por Alves y col. (2013). Por otro lado, los resultados de Isla y col (2011) sobre mieles del noroeste argentino, mostraron que en general éstas presentaban un contenido de compuestos fenólicos que no superaba los 400 µg de ácido gálico/g de miel, valor muy inferior al obtenido en nuestro trabajo.

Como ya mencionamos, las mieles de la región Andino Patagónica mostraron el contenido de antioxidantes más alto utilizando la técnica de ABTS ($P \leq 0,05$) (se obtuvo un valor de antioxidantes de 2,4 µmol equivalentes de Trolox/g de miel). Para el resto de las regiones el valor osciló entre los 1,4 y 0,7 µmol equivalentes de Trolox/g de miel, sin encontrarse diferencias significativas entre estas muestras ($P > 0,05$). El contenido de antioxidantes cuantificado mediante esta técnica resultó muy superior a los obtenidos por Chang y col. (2011) en mieles Chinas, aunque fue inferior a los encontrados por Ciappini y col. (2013) en mieles monoflorales argentinas. Al comparar el contenido de antioxidantes determinado por la técnica de FRAP se encontró que éste resultó superior al encontrado en mieles de la provincia de Buenos Aires de cosechas anteriores, y superior a los informados en trabajos de mieles de Brasil; pero resultaron ser inferiores a mieles mejicanas (Ruiz-Navajas y col., 2011, Patrignani y col., 2016). Finalmente, el contenido de antioxidantes determinado por el método de DPPH fue del orden y hasta levemente superior a los valores encontrados por Kuś y col. (2014) en mieles polacas. Al comparar los valores obtenidos con los publicados por Ciappini y col. (2013) en mieles monoflorales de trébol y eucalipto de la región Pampeana Argentina, se encontró que el contenido de antioxidantes por DPPH en las mieles analizadas en nuestro trabajo resultó ser similar a los valores obtenidos por estos autores para mieles de trébol, pero inferiores a los de mieles de eucalipto. La variabilidad del contenido de antioxidantes en mieles puede deberse a distintos factores, no sólo a su procedencia geográfica, sino también al procesamiento, la manipulación, factores ambientales como el contenido de humedad, la temperatura y las condiciones de almacenamiento (Frankel y col., 1998, Gheldof y Engeseth, 2002). Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que las mieles analizadas presentan una buena capacidad antioxidante, y que a pesar de las diferencias encontradas en muestras del mismo origen geográfico, el contenido de antioxidantes podría ser un indicador de la procedencia de las mieles.

Para evaluar la correlación entre las variables se calcularon los coeficientes de Pearson, que representan una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no depende de las unidades de medida de las variables (Balzarini y col., 2008). Los resultados se pueden observar en la Tabla 4.6.

Capítulo 4 Mieles y Rellenos

Tabla 4.6. Coeficientes de correlación entre la capacidad antioxidante (cuantificada mediante las técnicas de ABTS, DPPH y FRAP), compuestos fenólicos, color y conductividad en mieles argentinas

	Conductividad	Color	CFT	ABTS	DPPH	FRAP
Conductividad	1					
Color	0,69	1				
CFT	0,77	0,84	1			
ABTS	0,99*	0,67	0,8	1		
DPPH	0,85	0,71	0,96*	0,9*	1	
FRAP	0,7	0,77	0,99*	0,75	0,96*	1

* Correlaciones significativas ($P \leq 0,05$ y $r \leq 0,9$)

A partir del análisis de correlación entre variables se encontró que el poder antioxidante medido con la técnica de ABTS mostró una importante correlación ($r = 0,99$; $P \leq 0,05$) con la conductividad. Ésta, a su vez, es un indicador del contenido de minerales, y en menor medida de ácidos orgánicos y aminoácidos presentes en la muestra (Baldi, 2010). Algunos trabajos han sugerido que los elementos minerales traza en las mieles pueden aportar a la capacidad antioxidante de las mismas al actuar como donores de electrones; se podría inferir entonces que la actividad antioxidante por ABTS estaría relacionada al contenido de minerales de la muestra. Por otro lado, las técnicas de DPPH y FRAP se relacionaron con el contenido de compuestos fenólicos de la muestra medido por la técnica de Folin. Los compuestos fenólicos presentes en la miel serían capaces entonces de actuar como antioxidantes estabilizando los radicales libres (como el DPPH), y también actuando como donores de electrones (para reducir el Fe (III) a Fe (II) en el ensayo de FRAP). Tal como se mencionó en la Introducción (sección 1.1.1.5) los compuestos fenólicos son excelentes donadores de hidrógeno o electrones, lo que detiene la reacción en cadena de los radicales libres. Luego, los intermediarios radicalarios de los compuestos fenólicos son relativamente estables, debido a la deslocalización por resonancia y a la carencia de posiciones adecuadas para el ataque por el oxígeno molecular (Nawar, 2000).

Se encontraron excelentes correlaciones entre el poder antioxidante medido por las técnicas de FRAP y DPPH ($r = 0,96$; $P \leq 0,05$), a pesar de que estos dos ensayos se fundamentan en distintos mecanismos. Esta correspondencia entre ambos ensayos ya había sido observada previamente (capítulo 3, sección 3.4.2.3).

Finalmente, al analizar el color de las mieles, se encontró que el mismo no presentó correlaciones significativas con las medidas de capacidad antioxidante ($P > 0,05$). Sin embargo, sí se encontró una buena correlación ($r = 0,84$, $P = 0,16$) con el contenido de compuestos fenólicos; esta correlación ya había sido descripta previamente por Isla y col. (2011) en mieles del noroeste argentino.

4.4.1.4 Compuestos volátiles en mieles y origen floral

El aroma (y por lo tanto también el *flavor*) de la miel es el resultado de una compleja combinación de compuestos volátiles que pueden tener distintos orígenes: origen floral/geográfico de la miel, condiciones de procesamiento, tiempo de conservación, e incluso puede provenir de la acción de las abejas. Se han aislado más de 400 compuestos en mieles y algunos han sido utilizados como indicadores del origen de las mismas. Por ejemplo, se considera que las diacetonas, los alcanos y los compuestos sulfurados son indicadores de miel de eucalipto (da Silva y col., 2016). Otros compuestos como los furanos y sus derivados (furfural, 2-acetilfurfural y metilfurfural) son el resultado de la degradación de azúcares; su contenido puede aumentar con el tiempo y la temperatura de conservación, y pueden indicar si la muestra sufrió un tratamiento térmico (Castro-Vázquez y col., 2008).

La miel, además, puede absorber compuestos volátiles del ambiente. El uso de humo por parte de los productores para el control de la abejas durante el proceso de remoción de los panales influye sobre el perfil de compuestos volátiles presentes en la miel (Tananaki y col., 2009). El análisis de volátiles también permite determinar la presencia de compuestos utilizados para la fumigación o control de plagas de las colmenas, tales como el 1,2-dibromoetano (EDB), el 1,4-diclorobenceno (PDCB) y el naftaleno. Estos químicos son utilizados por los productores para combatir distintas plagas; son potenciales cancerígenos y algunos como el EDB han sido prohibidos (Tananaki y col., 2005^a).

En las mieles analizadas se encontraron 110 compuestos que se pueden observar en el Anexo I. Los compuestos encontrados con mayor frecuencia en las muestras fueron el C3 (octano), el C4 (furfural), el C18 (heptanal), el C30/C40 (trimetil benceno), el C32 (2,6 dimetil-1,6 octadieno), el C46 (fenilacetaldehído), el C62 (nonanal) y el C101 (tridecano), que estuvieron presentes en el 100% de las muestras, mientras que el C16 (nonano), el C43 (limoneno), el C55 (metil isopropilbenceno) y el C95 (p-menten-9-al) se identificaron en el 96 % de las mieles.

Wardencki y col. (2009) encontraron que compuestos como el alcohol bencílico y el furfural se encontraban en un gran número de muestras, independientemente de su origen floral. En cambio, compuestos como el tridecano (C101) o el nonanal (C62) han sido considerados indicadores de origen floral: el tridecano se considera un indicador de origen floral de *Tolpis virgata* en mieles de Palestina, mientras que el nonanal se considera un indicador de mieles de mielada provenientes de pino en Grecia (Tananaki y col., 2005^b; Odeh y col., 2007). Sin embargo, las muestras analizadas en esta tesis eran mieles florales, no encontrando ninguna miel de mielada ni procedente de *Tolpis virgata*. Por otro lado el heptanal (C18), es considerado característico de mieles de lavanda (*Lavandula angustifolia*) (Bouseta y col., 1992). Esta especie tampoco fue identificada como fuente de polen en las mieles analizadas,

aunque sí se encontraron mieles procedentes de *Prunella vulgaris*, de la familia *Lamiaceae* igual que la lavanda. Pólenes de esta familia se han encontrado en mieles de la Patagonia Extra Andina (Forcone y Tellería, 2000; Forcone 2003). *Prunella vulgaris* sería una especie adventicia distribuida tanto en Río Negro como en Neuquén y Chubut (<http://www.floraargentina.edu.ar...>).

Si bien nuestros resultados difieren de las referencias bibliográficas, coinciden con los obtenidos por Baroni y col (2009). Estos autores también encontraron compuestos que se consideran indicadores de mieles monoflorales como benzenacetaldéido, benzaldehído o liliacaldehído en gran parte de las muestras analizadas en mieles argentinas, independientemente de su origen floral.

El análisis palinológico mostró que casi el 60 % de las mieles de la zona andina se podrían clasificar como mieles monoflorales provenientes de: *Prunella vulgaris*, *Larrea sp*, *Aristotelia chilensis* (maqui) o *Cytisus scoparius* (retama de las escobas) (Figura 4.11) Las mieles analizadas de las regiones Talar y Pampeana Oriental de la provincia de Buenos Aires resultaron ser todas monoflorales, la mayor parte de *Lotus sp*. Las mieles de la región Paranaense, en cambio, resultaron en su mayoría multiflorales, a excepción de una que resultó ser monofloral de Eucaliptus. Esta muestra, comprada directamente al productor, había sido clasificada y rotulada por el mismo como “monofloral de naranjo”.

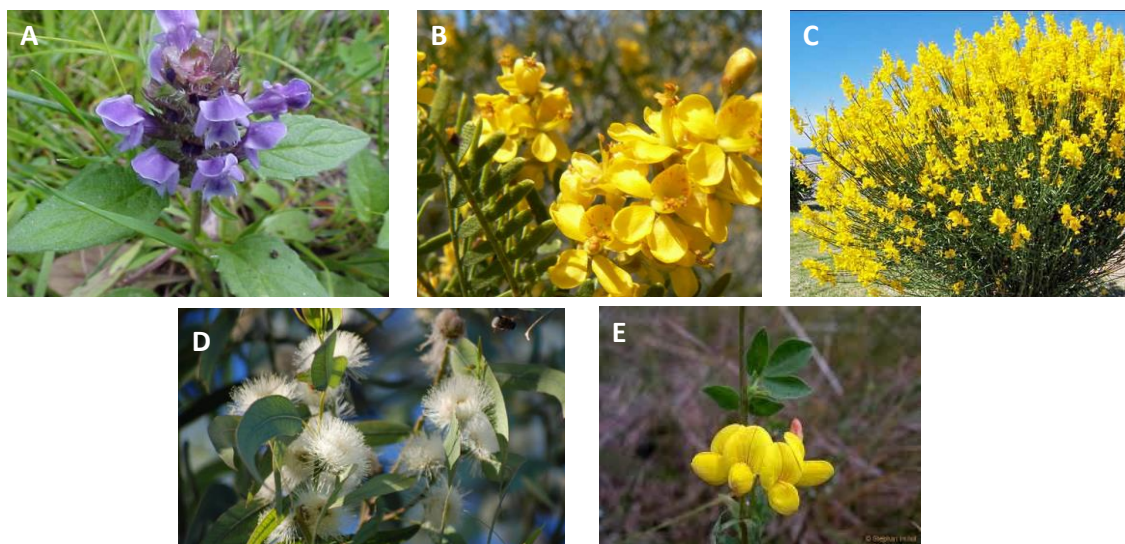


Figura 4.11. Origen floral de algunas mieles analizadas *Prunella vulgaris* (A), *Larrea sp* (B), *Cytisus scoparius* (retama de las escobas) (C), *Eucalyptus* (D) y *Lotus sp* (E)

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el contenido de 27 de los compuestos volátiles aislados; estos resultados se muestran en el Anexo II. La región Andino Patagónica presentó un contenido significativamente superior de 25 de los compuestos

aislados (C2, C3, C18, C21, C23, C26, C33, C41, C44, C47, C48, C49, C51, C54, C60, C62, C65, C68, C71, C78, C79, C83, C86, C90 y C102). Un aspecto interesante del perfil de compuestos volátiles encontrado en las muestras de la región andina es su alto contenido de lilac aldehído. Este compuesto posee 3 carbonos quirales, lo que da lugar a sus estereoisómeros (Stashenko y Martínez, 2013), como el lilac aldehído D, cuya estructura se puede observar en la Figura 4.12.

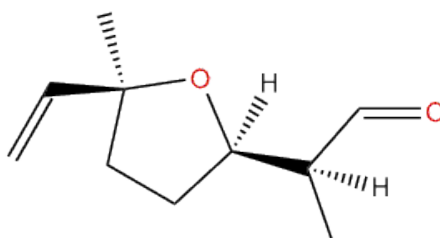


Figura 4.12. Estructura del lilac aldehído D (Extraído de <http://www.pherobase.com/database/floral-compounds...>)

El lilac aldehído generalmente es considerado un indicador de mieles cítricas; sin embargo, el análisis palinológico no detectó la presencia de polen proveniente de *Citrus* spp en las muestras de esta región. Baroni y col. (2006) ya habían detectado la presencia de lilac aldehído en muestras de mieles no cítricas recolectadas en Argentina.

Por otro lado, la región de Talar presentó los mayores valores del C82 (naftaleno) mientras que el C32 (dimetil octadieno) resultó ser significativamente más alto en las mieles de la región Paranaense. El naftaleno se encontró en el 83 % de las muestras de la región del Talar; la presencia de este compuesto en miel es importante por su carácter tóxico. Los productores utilizan este químico para combatir las polillas (*Galleria mellonella* y/o *Achroia grisella*) (Tananaki y col., 2005^a). Un artículo publicado en el año 2004 en el portal apícola (<http://www.apicultura.entupc.com/...>) mostró que los apicultores entrevistados ven en las bolitas de naftalina y el laurel dos métodos eficaces para contrarrestar el avance de las polillas. Aunque actualmente no exista regulación acerca de los límites del naftaleno en mieles, por sus potenciales peligros para la salud y su dificultad para ser eliminado de la cera, se hace imprescindible el control de este tipo de residuo en la miel (Tananaki y col., 2005^a).

Los resultados obtenidos hasta aquí indican que las mieles de la región Andino Patagónica presentan más compuestos volátiles y con un perfil más complejo que el de las mieles de las regiones de Buenos Aires analizadas. Además tienen un alto contenido de antioxidantes y una baja humedad por lo que fueron seleccionadas para su uso en rellenos de galletitas. Por otro lado, el análisis comparativo con los datos de bibliografía demostró que sería necesaria una revisión de los compuestos considerados indicativos de mieles monoflorales (como el lilac aldehído, el tridecano y el heptanal).

4.4.2 Incorporación de miel a los rellenos de galletitas

Las respuestas obtenidas para el contenido de antioxidantes y la textura de los rellenos fueron modeladas de acuerdo a la metodología explicada en la sección 4.3.3.3.

4.4.2.1 Antioxidantes en los rellenos

El contenido de antioxidantes en la miel se ha comparado con la capacidad antioxidante que presentan frutas y verduras en base seca. Es por esto que se considera una alternativa saludable para reemplazar el azúcar en distintos productos (Gheldof y Engeseth, 2002).

Los rellenos formulados según la Tabla 4.2 presentaron diferencias significativas en el contenido de antioxidantes, mediante las dos técnicas ensayadas ($P \leq 0,05$). Según el ensayo de FRAP, el relleno con la mínima capacidad antioxidante lo presentó la formulación 5, la cual no contenía miel. Por otro lado, el ensayo de DPPH indicó que la formulación 11 (con un 46 % de miel) era la que presentaba el mayor poder antioxidante.

Los valores de μmol equivalentes de Trolox obtenidos mediante la técnica de FRAP resultaron ser en general superiores a los obtenidos por la técnica de DPPH. Esto puede deberse a que estas técnicas utilizan solventes diferentes: la técnica de FRAP utiliza un medio acuoso acidificado, mientras que la técnica de DPPH requiere un medio etanólico. Gökmen y col. (2009) ya habían observado que el solvente utilizado en las distintas técnicas es determinante en la cuantificación del contenido de antioxidantes, ya que en ciertos alimentos la localización física de los antioxidantes podría dificultar su reacción. Los resultados en los rellenos con miel sugieren que, por la naturaleza de los rellenos, el medio acuoso pudo ingresar mejor en la matriz del alimento permitiendo un mejor contacto del reactivo con los antioxidantes. Los datos fueron modelados matemáticamente; en la Tabla 4.7 se muestran los coeficientes de regresión obtenidos para las variables codificadas miel, azúcar y manteca de cacao.

Tabla 4.7 Coeficientes de regresión de los modelos de superficie-respuesta de la capacidad antioxidante de los rellenos medida por los métodos de FRAP y DPPH, expresados en función de los valores codificados de las variables miel, azúcar y manteca de cacao. Se incluyen también los valores obtenidos de precisión adecuada y falta de ajuste utilizados para comprobar la adecuación del modelo.

	FRAP	DPPH
Miel	0,60	2,36
Azúcar impalpable	0,24	0,68
Manteca de cacao	0,08	1,64
Precisión adecuada	28,45	6,12
Falta de ajuste	0,48	0,55

Tal como se mencionó en Materiales y Métodos de este capítulo, el parámetro “precisión adecuada” compara el rango de los valores previstos en los puntos de diseño con el error medio de predicción. Valores mayores a 4 indican que el modelo es adecuado. Los coeficientes de regresión indican el peso relativo de cada variable en la respuesta, en este caso, en la capacidad antioxidante. Se puede observar que la miel fue el ingrediente que generó el mayor incremento en el poder antioxidante de los rellenos. Esto era esperable, ya que la miel es un alimento rico en antioxidantes, tal como quedó demostrado en la sección 4.4.1.3. El poder antioxidante medido por la técnica de DPPH sugiere que la manteca de cacao también contribuiría a la capacidad antioxidante de los rellenos, aunque menos que la miel. Esto pudo deberse a los antioxidantes que naturalmente están presentes en la manteca de cacao, tales como compuestos fenólicos, fitoesteroles y tocoferoles (Harris y col., 1972; Nattress y col., 2004; Mohamad y col., 2016). Estos antioxidantes parecen ser más sensibles al ensayo de DPPH que al ensayo de FRAP en los rellenos analizados, probablemente porque los antioxidantes de la manteca de cacao tengan mayor actividad en el medio eanólico del DPPH que en el medio ácido acuoso del ensayo de FRAP. En la Figura 4.13 se pueden observar los gráficos de contorno obtenidos para los distintos ensayos de antioxidantes.

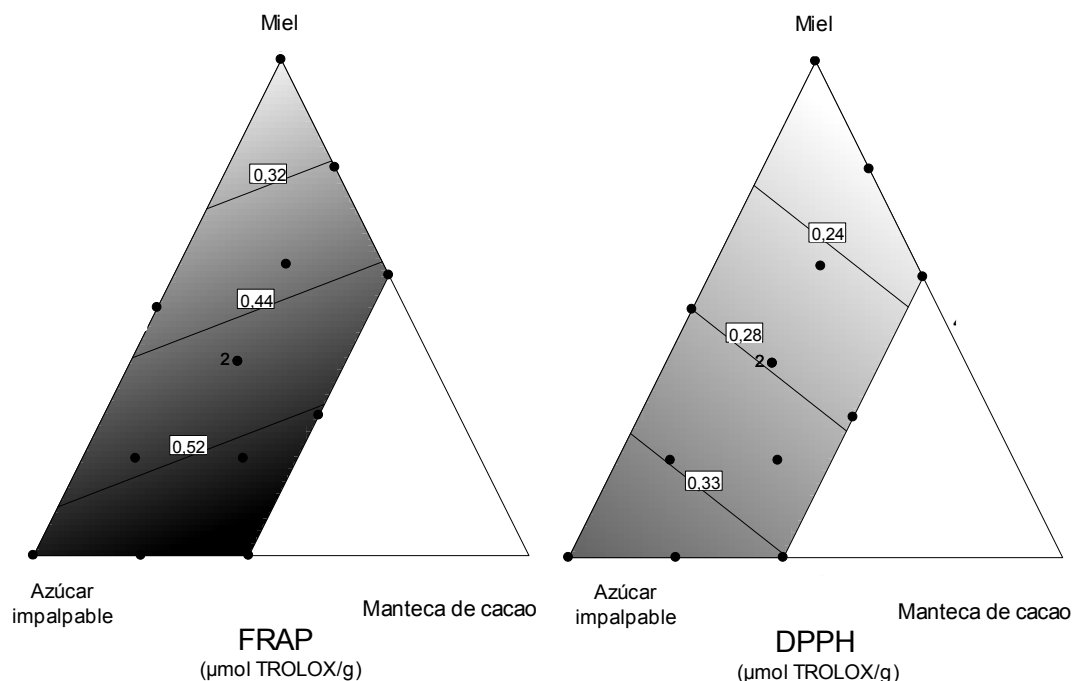


Figura 4.13. Gráficos de contorno de la capacidad antioxidante, medidos por las técnicas de DPPH y FRAP de las formulaciones de rellenos dulces. Las líneas representan formulaciones con capacidad antioxidante equivalente. El punto marcado como 2 corresponde a un duplicado

4.4.2.2. Actividad acuosa (a_w) de los rellenos dulces

Se encontraron diferencias significativas en la actividad acuosa, entre los distintos rellenos ensayados. Sin embargo, en todos los casos la actividad acuosa fue menor que 0,60 lo cual indica una buena estabilidad microbiológica para todos los rellenos analizados, independientemente de su formulación. Los valores se pueden observar en la Tabla 4.8.

En este caso, ninguno de los factores analizados (miel, azúcar o manteca de cacao) ejerció un efecto significativo sobre la actividad acuosa, y estos parámetros no pudieron ser ajustados a ningún modelo matemático.

Tabla 4.8. Valores de a_w de las distintas formulaciones.

Formulación	Miel	Azúcar impalpable	Manteca de cacao	Actividad Acuosa (a_w)
1	20	46	10	$0,534 \pm 0,002^{b,c}$
2	23	23	30	$0,544 \pm 0,001^{c,d}$
3	10	46	20	$0,540 \pm 0,001^c$
4	46	0	30	$0,583 \pm 0,001^e$
5	0	46	30	$0,532 \pm 0,001^{b,c}$
6	46	20	10	$0,555 \pm 0,003^d$
7	33	33	10	$0,542 \pm 0,007^c$
8	37	14	25	$0,527 \pm 0,007^{a,b}$
9	19	37	20	$0,539 \pm 0,007^{b,c}$
10/13	28	28	20	$0,520 \pm 0,011^a$
11	46	10	20	$0,541 \pm 0,004^c$
12	37	24	15	$0,536 \pm 0,001^{b,c}$

Los valores informados corresponden a las medias \pm las desviaciones estándar. Superíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente ($P > 0,05$).

4.4.2.3 Textura y optimización de la formulación de los rellenos

La textura es uno de los principales parámetros sensoriales que define la aceptabilidad de un producto como las galletitas. García Loredó y Guerrero (2011) analizaron la relación entre los parámetros instrumentales y sensoriales de textura de distintos alimentos consumidos por los argentinos. Según sus resultados, los rellenos de galletitas comerciales no poseen una característica de textura predominante, sino que su textura es una combinación de al menos tres características principales: elasticidad, adhesividad y cohesividad, a la vez que presentan una baja fracturabilidad. Estos parámetros deben guardar un delicado equilibrio entre sí para que el producto sea aceptado por el consumidor: debe ser adhesivo para poder mantener

unidas las tapas, pero no debe generar una sensación “pegajosa” en la boca. Por otro lado, debe ser firme para mantener la estructura del producto sin colapsar, y sin escurrirse al ser mordido (Manley, 1983; Tanti y col., 2016).

- Adhesividad y cohesividad

En la Tabla 4.8 se pueden ver los distintos coeficientes del modelado matemático obtenido para la adhesividad y la cohesividad. Todos los modelos propuestos presentaron un valor de falta de ajuste no significativo ($P > 0,05$), mientras que la “precisión adecuada” resultó superior a 4; lo que indica un buen ajuste del modelo. En todos los casos se consideraron únicamente los términos significativos ($P \leq 0,05$) para el desarrollo del modelo.

Tabla 4.8. Coeficientes de regresión, precisión adecuada y falta de ajuste de los modelos predictivos de la adhesividad y la cohesividad en rellenos, expresados en función de los valores codificados de las variables

Coeficientes de Regresión	Adhesividad	Cohesividad
Miel	0,83	0,49
Azúcar impalpable	-0,60	-0,02
Manteca de cacao	1,65	0,32
Precisión Adecuada	7,62	8,26
Falta de ajuste (P)	0,99	0,80

La adhesividad presentó una relación positiva con el contenido de miel y manteca de cacao, siendo esta última más importante que la primera. La adhesividad es un parámetro que indica la energía necesaria para superar las fuerzas atractivas entre el alimento y la superficie de un material que entró en contacto con el mismo (en este caso la sonda de aluminio del texturómetro) (Szczesniak, 2002). En productos como los rellenos de galletitas, la adhesividad permite que las tapas de las galletitas se mantengan unidas. El aumento de adhesividad por la presencia de azúcares presentes en la miel ya había sido comprobado en productos como masas de galletitas por Conforti y Lupano (2004); probablemente esto se deba a la naturaleza adhesiva de la miel (Oroian y col., 2016). Por otro lado, los estudios de Keijbets y col (2009) habían demostrado la característica adhesiva del chocolate con superficies como el acero inoxidable y vidrio de cuarzo. Tal como se puede observar en la Tabla 4.8, la manteca de cacao tiene un efecto más pronunciado en la adhesividad que la miel, mientras que esta tendencia se invierte en la cohesividad, siendo la miel la que tiene un efecto predominante.

La cohesividad representa la fuerza que mantiene al producto unido como un todo (Szczesniak, 2002; Glibowski, 2008). Tal como se puede observar en la Tabla 4.8 la miel fue el parámetro que más afectó esta propiedad, lo que indicaría que es el principal ingrediente que mantiene la estructura del relleno, probablemente por su capacidad de formar puentes de hidrógeno. La presencia de azúcar en los rellenos, en cambio, disminuye la cohesividad de las muestras, aunque en una baja proporción. Igualmente, es importante resaltar que la presencia de azúcar también generó una disminución en la adhesividad de las muestras. Esto indicaría que el tipo de azúcar utilizado podría interferir en la estructura de los rellenos, tal como lo informó Battaiotto y col. (2013). En los rellenos se utilizó azúcar impalpable, que contiene como antiaglutinante almidón de maíz; la presencia de éste parecería limitar la formación de un producto adhesivo, característica poco deseable para un producto como los rellenos de galletitas, ya que provocaría que las tapas se separen.

Los parámetros de adhesividad y cohesividad obtenidos a partir de los modelados desarrollados fueron graficados en la Figura 4.14.

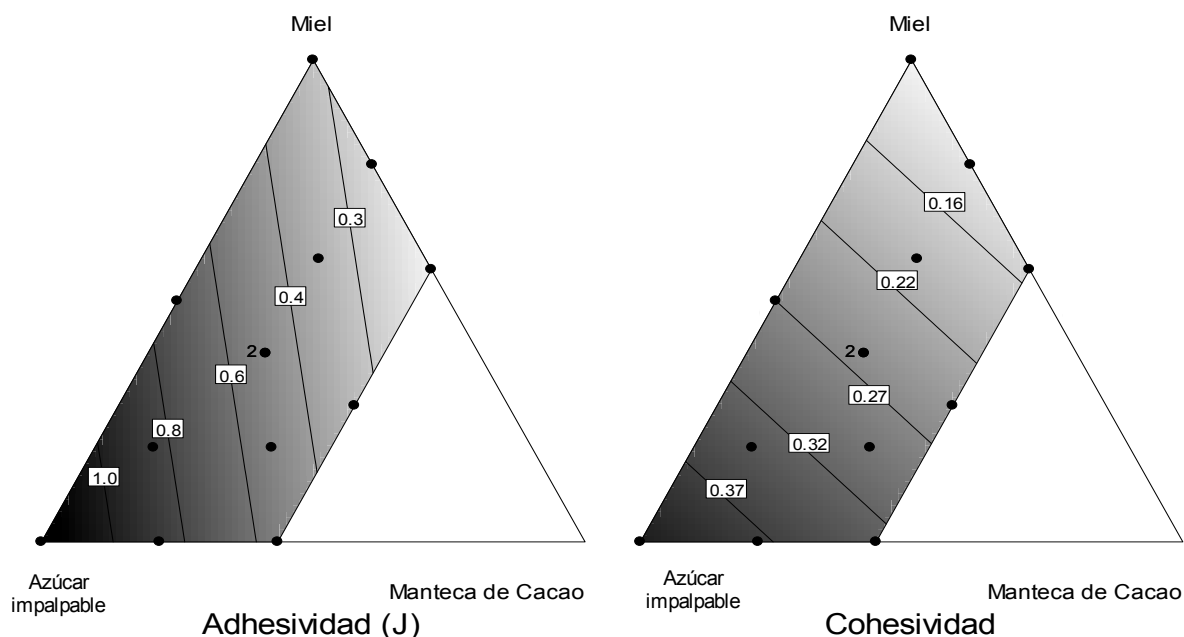


Figura 4.14. Gráficos de contorno de la adhesividad y cohesividad en las formulaciones de rellenos de galletitas dulces. Las líneas representan formulaciones con igual cohesividad o adhesividad. El punto marcado como 2 corresponde a un duplicado

- Firmeza, elasticidad y tiempo de relajación

La firmeza, elasticidad y tiempo de relajación también fueron modelados matemáticamente de una manera similar a la adhesividad y la cohesividad. Los valores obtenidos para estos parámetros se pueden encontrar en la Tabla 4.9.

Capítulo 4 Mieles y Rellenos

Tabla 4.9. Coeficientes de regresión, precisión adecuada y falta de ajuste de los modelos predictivos de la firmeza, elasticidad y tiempo de relajación, expresados en función de los valores codificados de las variables

	Firmeza	Elasticidad	Tiempo de relajación
Miel	-167,74	-0,29	-0,33
Azúcar impalpable	195,10	0,34	0,48
Manteca de Cacao	-275,63	0,44	-0,53
Miel x Manteca de Cacao	910,99	-	2,22
Precisión adecuada	12,15	12,03	8,70
Falta de ajuste	0,52	0,15	0,65

Como se explicó previamente, en los rellenos de galletitas es importante que la firmeza sea alta para poder estabilizar la estructura sin colapsar por el peso de la tapa (Tanti y col., 2016). La presencia de miel y de manteca de cacao en las muestras disminuyó significativamente la firmeza de los rellenos, aunque el efecto de este segundo ingrediente fue mucho más importante que el efecto del primero. La disminución en la firmeza de las muestras por la presencia de manteca de cacao podría explicarse por el efecto lubricante de la grasa, que genera una consistencia más blanda (Maache-Rezzoug y col., 1998). El efecto más interesante sobre la firmeza de las muestras resultó ser la interacción entre la manteca de cacao y la miel. Si bien ambos ingredientes individualmente generaron un efecto negativo sobre la firmeza, la combinación de ambos resultó en un importante efecto positivo.

La elasticidad indica la capacidad que tiene la muestra de volver a su forma original luego de una deformación. Los valores encontrados fueron en general más bajos que los obtenidos en rellenos dulces comerciales (Battaiotto y col, 2013). El valor máximo de elasticidad se encontró en la formulación 5 ($0,47 \pm 0,07$), que corresponde a un relleno con 0 % de miel, 46 % de azúcar y 30 % de manteca de cacao, seguido por la formulación 3 ($0,31 \pm 0,03$), que corresponde a un relleno con 10 % de miel, 46 % de azúcar y 20 % de manteca de cacao (estos resultados se pueden encontrar en el Anexo III). Por otro lado, la elasticidad presentó una relación lineal positiva con la presencia de azúcar refinada y de manteca de cacao, mientras que la incorporación de miel presentaba una relación negativa, aunque este efecto fue mucho menos pronunciado. Yamul y Lupano (2003) ya habían informado que la presencia de miel generaba una leve disminución en la elasticidad de geles preparados con suero lácteo. Este comportamiento se repitió en geles formulados con harina de trigo y lactosuero (Yamul y Lupano, 2005).

El tiempo de relajación es un parámetro que se asocia al comportamiento viscoelástico de la muestra: tiempos de relajación prolongados indican un comportamiento más sólido-elástico, mientras que tiempos cortos indican un comportamiento más viscoso (Lupano y col., 1992). Los tiempos de relajación encontrados en los rellenos resultaron ser mucho menores

que los informados en rellenos comerciales, lo que indicaría que los rellenos en el presente trabajo fueron más viscosos que los rellenos actualmente comercializados (Battaiotto y col., 2015). Además, se encontró que el tiempo de relajación disminuía con la presencia de miel y manteca de cacao. Este efecto de la miel ya había sido comprobado por Conforti y Lupano (2004) en masas de galletitas semidulces. El análisis estadístico mostró también que la interacción entre la manteca de cacao y la miel aumentaba significativamente el tiempo de relajación de las muestras. Esto indicaría que la interacción entre ambos ingredientes no sólo genera un producto más firme, sino también con características más elásticas. Este comportamiento no se observó con el azúcar (sacarosa). Las diferencias observadas sugieren que el tipo de interacción con la manteca de cacao depende del tipo de azúcar utilizado. Belščak-Cvitanović y col. (2015) también encontraron que chocolates ricos en fructosa presentaban una firmeza mayor y un comportamiento más elástico que los chocolates preparados con sacarosa. Según estos autores, la textura de los chocolates está directamente relacionada con el tamaño de partícula que presenta y éste, a su vez, depende del tipo de azúcar utilizado.

Los gráficos obtenidos a partir de los modelos de firmeza, elasticidad y tiempo de relajación desarrollados se muestran en la Figura 4.15.

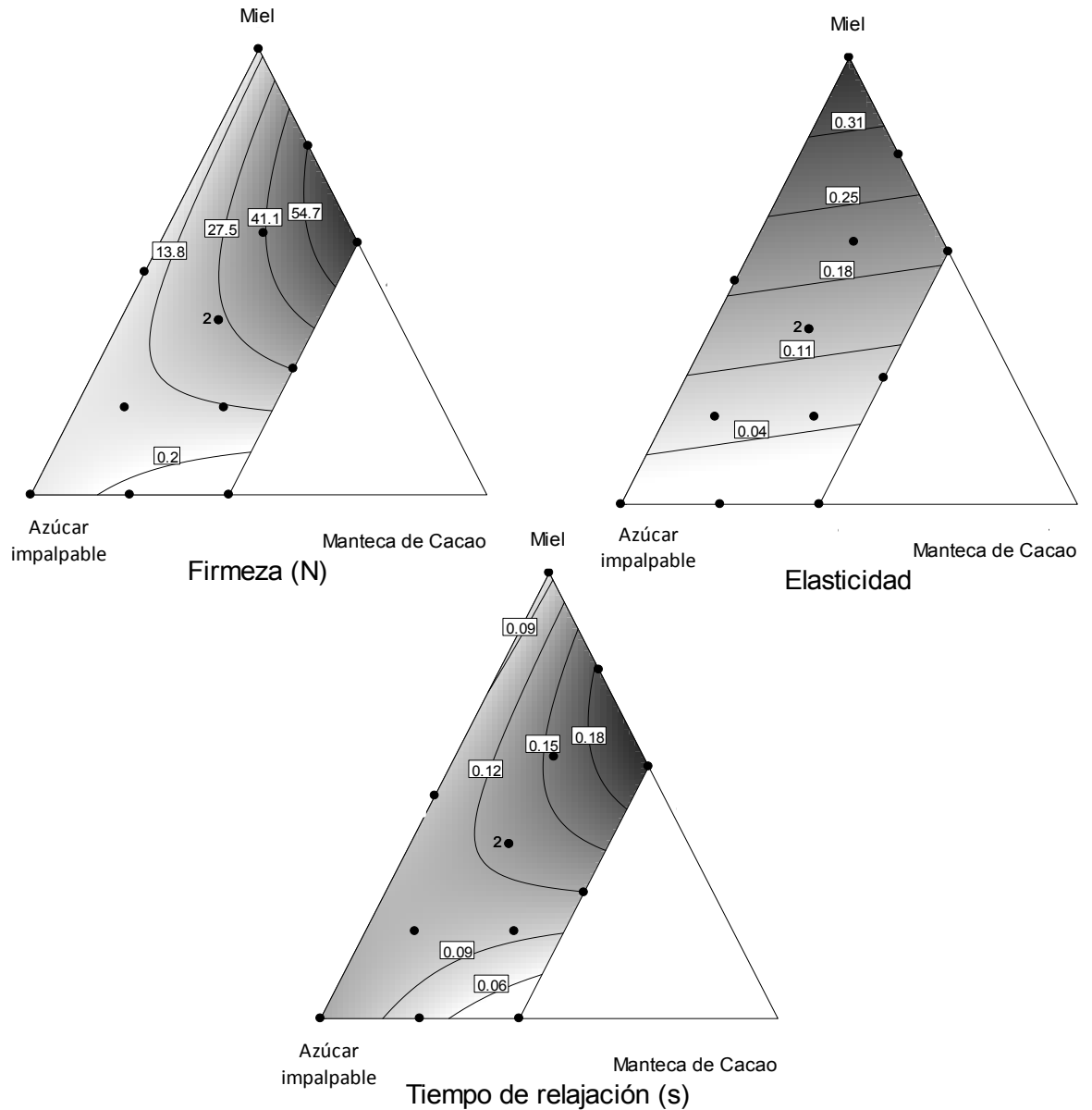


Figura 4.15. Gráficos de contorno de firmeza, elasticidad y tiempo de relajación en las formulaciones de rellenos de galletitas dulces. Las líneas representan formulaciones con igual nivel de firmeza, elasticidad y tiempo de relajación. El punto marcado como 2 corresponde a un duplicado.

- Optimización de los rellenos

Una vez obtenidas las ecuaciones que predicen el comportamiento del producto, se definieron las funciones objetivos sobre las siguientes variables: adhesividad, cohesividad, firmeza, elasticidad y tiempo de relajación. Además se buscó minimizar el contenido de azúcar y de manteca de cacao y maximizar el contenido de miel en la formulación final del relleno.

En la Tabla 4.10 se puede observar el criterio utilizado para la optimización de cada variable y la respuesta predicha por los modelos propuestos.

Tabla 4.10. Criterios utilizados para la optimización de la formulación

Variables	Criterio de optimización	Respuestas predichas
Adhesividad (J)	Máximo	0,459
Cohesividad	Máximo	0,207
Firmeza (N)	Máximo	27,307
Elasticidad	0,227	0,227
Tiempo de relajación (s)	Máximo	0,132

Según los resultados obtenidos, la formulación óptima para cumplir con los requisitos de la optimización contenía 17,7 % de miel, 33,8 % de azúcar y 24,5 % de manteca de cacao. Esta nueva formulación implica una reducción del contenido de sacarosa del 26,5 %, mientras que la manteca de cacao pudo reducirse casi en un 20 % (considerando como referencia la formulación inicial que contenía 30 % de manteca de cacao y 46 % de azúcar). La deseabilidad obtenida tal como se describe en la sección (4.3.3.4) fue de 0,6; que indica una optimización lo suficientemente aceptable. Además, la formulación optimizada permitió maximizar el contenido de miel de los rellenos manteniendo una textura deseable. Este es un aspecto de suma importancia, no sólo por la alta capacidad antioxidante que aporta la miel, sino también porque, como se indicó en la introducción, este ingrediente proporciona múltiples beneficios para la salud.

Una vez obtenida la formulación óptima, se la utilizó para elaborar rellenos dulces. Sobre este producto se evaluaron la adhesividad, la cohesividad, la firmeza, el tiempo de relajación y la elasticidad, y se compararon estos valores con los predichos por los modelos, obteniéndose los valores que se presentan en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11. Valores experimentales de adhesividad, cohesividad, firmeza, tiempo de relajación y elasticidad obtenidos para una formulación de relleno de galletitas con miel. Se observa también el p-valor obtenido para la prueba T de Student realizada contra los valores predichos por el modelo.

Parámetros	Valor obtenido	p-Val*
Adhesividad (J)	0,54	0,19
Cohesividad	0,22	0,66
Firmeza (N)	21,13	0,06
Tiempo de relajación (s)	0,13	0,99
Elasticidad	0,15	0,13

*Un p-val > 0,05 indica que los valores experimentales y los predichos no se diferencian significativamente

El análisis estadístico mostró que los rellenos obtenidos experimentalmente con la formulación optimizada no se diferenciaron significativamente de los parámetros predichos por el modelo ($P > 0,05$). Por lo tanto, se pudo concluir que el modelo matemático utilizado fue capaz de predecir adecuadamente el comportamiento de los atributos analizados.

4.4.3 Conservación de los rellenos

Utilizando la formulación de rellenos control preparados a partir de la formulación recomendada por Battaiotto y col. (2013) y el relleno optimizado con miel (obtenido tal como se describe en la sección 4.4.2.3), se prepararon rellenos que fueron envasados en bolsas de polipropileno y conservados a 20 °C por 6 meses. Durante este tiempo se evaluó el contenido de humedad, la actividad acuosa y la estabilidad de los antioxidantes. Finalizado el periodo de conservación, se evaluó la calidad microbiológica del producto y su textura.

4.4.3.1 Contenido de humedad, actividad acuosa y textura

La humedad de las muestras se determinó a distintos tiempos de conservación. El contenido de humedad de los rellenos con miel aumentó significativamente con el tiempo, alcanzando una humedad máxima de 9 %; los rellenos control, en cambio, presentaron una humedad máxima muy inferior, de 5 % (datos no mostrados). Estas diferencias probablemente se deban a que la miel es altamente higroscópica, por lo que en un envase como el polipropileno, permeable a la humedad ambiente, es capaz de absorber agua aumentando el contenido de humedad del producto. De acuerdo a este ensayo sería recomendable utilizar un envase impermeable al vapor de agua para estos rellenos.

Por otro lado se determinó la actividad acuosa de los rellenos durante el tiempo de conservación (Figura 4.16).

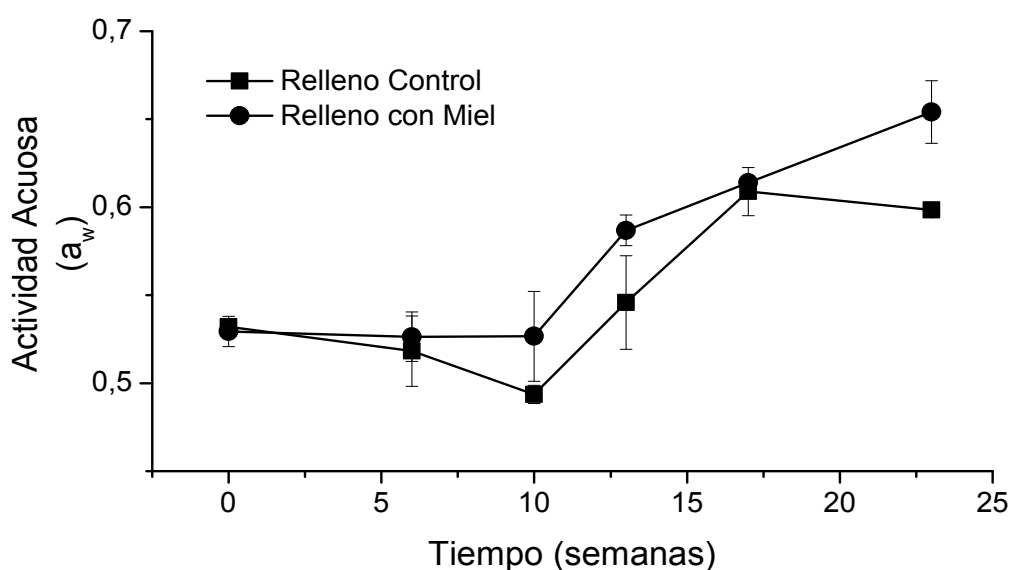


Figura 4.16. Actividad acuosa en rellenos control y con miel durante distintos tiempos de conservación. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

Si bien la actividad acuosa aumentó significativamente a lo largo del ensayo, el máximo valor obtenido resultó de 0,65, lo que aseguraría una buena estabilidad microbiológica.

Nuevamente, siguiendo la tendencia observada para la humedad, los rellenos con miel presentaron una actividad acuosa ligeramente superior a la encontrada para los rellenos control ($P \leq 0,05$). Sin embargo, si se consideran los valores de humedad obtenidos al final de la experiencia (9 % para los rellenos con miel y 5 % para los rellenos control), la a_w de los rellenos con miel no fue tan alta como se podría haber esperado. Probablemente esto se deba a la capacidad de los grupos hidroxilo de la miel de retener el agua absorbida, lo que generaría que el agua esté menos libre obteniéndose un valor de actividad acuosa relativamente bajo (Chirife, 1978).

El análisis de textura de los rellenos con miel al inicio y al final del tiempo de conservación mostró que los mismos no presentaron diferencias significativas en su firmeza, adhesividad, cohesividad ni tiempo de relación ($P > 0,05$), aunque sí aumentaron su elasticidad ($P \leq 0,05$). Los rellenos control, en cambio, incrementaron su dureza durante el tiempo de conservación ($P \leq 0,05$). Estos resultados se pueden observar en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Parámetros de textura de los rellenos con miel y control al inicio (0 semanas) y al finalizar (24 semanas) el tiempo de conservación

	Relleno Control		Relleno con miel	
	0 semanas	24 semanas	0 semanas	24 semanas
Dureza (N)	$7,94 \pm 2,21^a$	$37,50 \pm 8,95^b$	$21,13 \pm 4,31^a$	$23,80 \pm 4,26^a$
Adhesividad (J)	$0,09 \pm 0,03^a$	$0,18 \pm 0,10^a$	$0,54 \pm 0,15^a$	$0,38 \pm 0,30^a$
Cohesividad	$0,10 \pm 0,01^a$	$0,10 \pm 0,09^a$	$0,22 \pm 0,05^a$	$0,22 \pm 0,05^a$
Elasticidad	$0,47 \pm 0,07^a$	$2,11 \pm 1,59^a$	$0,15 \pm 0,03^a$	$5,25 \pm 1,04^b$
Tiempo de relajación (s)	$0,10 \pm 0,05^a$	$0,09 \pm 0,01^a$	$0,13 \pm 0,01^a$	$0,18 \pm 0,01^a$

Los valores informados corresponden a las medias \pm las desviaciones estándar. Superíndices iguales indican que las medias de cada parámetro antes y después del tiempo de conservación no se diferencian significativamente para cada muestra ($P > 0,05$).

Las diferencias en la textura de los rellenos probablemente se deban a la presencia de manteca de cacao en la formulación. Durante el tiempo de conservación pueden ocurrir transiciones polimórficas de los lípidos de esta fase grasa. Los arreglos estructurales asociados a estos cambios tienen una relación directa con la textura y el punto de fusión del producto (Afoakwa y col., 2007). Según Nightingale y col. (2011) durante el tiempo de conservación el chocolate puede volverse más duro como resultado de estas transiciones de la manteca de cacao, lo que coincide con el aumento de dureza del relleno control. El relleno con miel, en

cambio, no modificó su dureza durante el tiempo de conservación, probablemente por su menor contenido de este ingrediente y la presencia de miel en su formulación.

4.4.3.2 Oxidación lipídica

El contenido de peróxidos fue controlado cada 4 semanas, tanto en los rellenos con miel como en los rellenos control. El valor encontrado no superó los 0,5 mmol de oxígeno/kg de lípidos, y no aumentó significativamente durante el tiempo de conservación de 24 semanas ($P \leq 0,05$). Esto indicaría que los lípidos de los rellenos no se oxidaron durante su almacenamiento, a pesar de haber utilizado un envase permeable al oxígeno.

La manteca de cacao tiene una alta proporción de ácidos grasos insaturados, pero a su vez posee antioxidantes naturales en su composición (Mohamad y col., 2016). Esto explicaría el bajo nivel de oxidación lipídica encontrado en las muestras.

4.4.3.3 Estabilidad de los antioxidantes

Distintos estudios han demostrado que los antioxidantes presentes en la miel pueden disminuir durante el tiempo de conservación. Wang y col. (2004) evaluaron el efecto que tiene el tiempo de almacenamiento en mieles de distinto origen floral, y encontraron que luego de 6 meses las mieles de trébol reducían su poder antioxidante en un 30 %, mientras que la reducción en el poder antioxidante de mieles que provenían de trigo llegó hasta el 49 %. Esta reducción en el poder antioxidante fue acompañada por una significativa reducción en el contenido de compuestos fenólicos. Šarić y col. (2012) encontraron resultados similares en mieles conservadas durante un año a temperatura ambiente; sus resultados indican que el contenido de antioxidantes, flavonoides y compuestos fenólicos disminuyeron significativamente en mieles conservadas a los seis meses de almacenamiento. Nuevamente, al igual que Wang y col. (2004), Šarić y col. (2012) demostraron que el grado de disminución del poder antioxidante dependía fuertemente del origen floral de las mieles. Sin embargo, es probable que estos principios activos de las mieles, luego de un tiempo de conservación más prolongado (2 años), sean reemplazados por otros compuestos con poder antioxidante derivados de la reacción de Maillard, manteniéndose así el poder antioxidante global de las muestras (Brudzynski y Kim, 2011).

Durante el tiempo de almacenamiento se determinó la capacidad antioxidante de los rellenos mediante las técnicas de FRAP y DPPH. Ambas técnicas indicaron que a lo largo del ensayo los rellenos con miel presentaron un poder antioxidante superior al de los rellenos control (Tabla 4.13).

Capítulo 4
Mieles y Rellenos

Tabla 4.13. Capacidad antioxidante determinada por las técnicas de FRAP y DPPH en rellenos control y con miel a distintos tiempos de almacenamiento a 20°C.

Muestra	Tiempo (semanas)	Antioxidantes DPPH ($\mu\text{mol TROLOX/g}$)	Antioxidantes FRAP ($\mu\text{mol TROLOX/g}$)
Relleno control	0	$0,351 \pm 0,011^{ab}$	$0,493 \pm 0,022^a$
	4	$0,339 \pm 0,002^a$	$0,524 \pm 0,073^a$
	8	$0,434 \pm 0,002^d$	$0,560 \pm 0,001^{ab}$
	12	$0,358 \pm 0,009^{ab}$	$0,565 \pm 0,080^{ab}$
	24	$0,371 \pm 0,001^b$	$0,699 \pm 0,13^b$
Relleno miel	0	$0,439 \pm 0,020^d$	$1,157 \pm 0,046^c$
	4	$0,492 \pm 0,002^e$	$1,105 \pm 0,031^c$
	8	$0,530 \pm 0,012^f$	$1,168 \pm 0,127^c$
	12	$0,401 \pm 0,002^c$	$1,137 \pm 0,144^c$
	24	$0,407 \pm 0,010^c$	$1,379 \pm 0,048^d$

Los valores informados corresponden a las medias \pm las desviaciones estándar. Superíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente ($P > 0,05$).

4.4.3.4 Ensayo microbiológico

Al finalizar el tiempo de conservación (24 semanas), se evaluó la calidad microbiológica de los rellenos. Para esto se determinó el número de UFC de hongos, de levaduras y de bacterias aerobias mesófilas totales utilizando distintos medios de cultivo (YGC y PCA, respectivamente). A pesar de que los rellenos con miel tenían un contenido de humedad y actividad acuosa superiores al los rellenos control, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de bacterias, enterobacterias y hongos-levaduras entre ambos rellenos ($P > 0,05$).

En la cuantificación de microorganismos mesófilos totales se incluyen todos los microorganismos capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20 °C y 45 °C. Un recuento bajo indica una buena calidad sanitaria de los productos, además de las condiciones higiénicas de la materia prima y de las condiciones de manipulación (ANMAT, 2014). Altos recuentos, del orden de 10^6 gérmenes por gramo de alimento, suele ser indicio de descomposición (Anderson y Calderón, 1999). Por otro lado, la importancia de la cuantificación de hongos y levaduras radica en la capacidad que tienen estos microorganismos de crecer a actividades acuosas menores que las bacterias y generar distintos grado de deterioro y descomposición en los alimentos. Particularmente los hongos son de especial interés, ya que pueden generar micotoxinas que son estables y no se destruyen

durante el procesamiento, lo que puede derivar en intoxicaciones graves de los consumidores (ANMAT, 2014).

El contenido de hongos y levaduras fue inferior a 2 UFC/g, mientras que para las bacterias mesófilas totales el recuento obtenido fue de 3 UFC/g de muestra. Estos valores son inferiores a los requeridos para galletitas rellenas (Anderson y Calderón, 1999). Finalmente, el recuento de coliformes totales resultó inferior al límite de detección del método empleado (< 3 Número más probable de microorganismos/g).

Estos resultados corresponden a un producto de buena calidad higiénico sanitaria al final del proceso de conservación, esto está asociado a buenas condiciones de procesamiento y manipulación, así como a la buena calidad de las materias primas. Esto es de suma importancia en un producto como los rellenos de galletitas, sobre los que no se realiza ningún tratamiento térmico, a diferencia de las tapas. Se pudo concluir entonces que los rellenos de galletitas serían seguros para su consumo hasta 6 meses posteriores a su preparación.

4.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- Todas las mieles analizadas cumplían con las normativas del Código Alimentario Argentino en cuanto a su contenido de humedad. Las mieles de la región Andino Patagónica, presentaron un menor contenido de humedad que las mieles de Buenos Aires, por lo que serían más recomendables para la preparación de un producto como los rellenos de galletitas.

Todas las muestras presentaron niveles de hidroximetilfurfural menor a 40 mg/Kg y una actividad diastasa superior a las 8 UD exigidas por el Código Alimentario Argentino.

Se encontró una alta proporción de muestras con naftaleno en mieles de la región Talar, probablemente utilizado por los productores para combatir plagas como las polillas. Si bien no existe una regulación acerca de los límites de este compuesto en mieles, por sus efectos sobre la salud, no serían recomendadas para su uso en panificados saludables a los que apunta este trabajo de tesis.

Las mieles analizadas resultaron de colores claros, encontrándose diferencias entre las distintas regiones: las mieles de la región Pampeana Oriental de la provincia de Buenos Aires presentaron un color “blanco” mientras que las mieles recolectadas de otras regiones presentaron un color “ámbar claro”.

Las mieles analizadas presentaron un buen contenido de antioxidantes, al compararlas con mieles de otras regiones de la Argentina y del mundo. En general el mayor contenido de antioxidantes se encontró en las mieles de la región Andino Patagónica, mientras que las mieles de la región Pampeana Oriental de Buenos Aires, presentaron los menores valores de antioxidantes.

En las muestras analizadas, la actividad antioxidante cuantificada por la técnica de ABTS se relaciona con la conductividad, lo que indicaría que la capacidad antioxidante de las mieles podría explicarse no sólo por su contenido de compuestos fenólicos, sino también probablemente por su contenido de minerales.

El contenido de compuestos fenólicos define el poder antioxidante de las muestras cuantificado por FRAP y DPPH. Asimismo, el color de las muestras se correlacionaría con el contenido de compuestos fenólicos.

Las mieles argentinas analizadas parecen tener un perfil de compuestos volátiles único, distinto al de las mieles analizadas en otros países. A partir del análisis comparativo con las referencias bibliográficas, se podría concluir que sería necesaria una revisión de los compuestos volátiles habitualmente considerados indicadores de origen floral.

Las mieles de la región Andino Patagónica presentaron un alto contenido de 25 de los compuestos volátiles aislados. Esto indicaría que las mieles de la región Andino Patagónica

son más ricas en compuestos volátiles, en comparación con las mieles de las regiones de Buenos Aires analizadas.

Por su actividad antioxidante, su baja humedad, y su alto contenido de compuestos volátiles, las mieles de la región de la Patagonia Andina serían las más recomendadas para utilizar en rellenos dulces de galletitas.

- La incorporación de miel en los rellenos de galletita incrementa significativamente la capacidad antioxidante de los mismos sin modificar su actividad acuosa.

La presencia de miel y manteca de cacao en los rellenos incrementa la cohesividad y la adhesividad de los rellenos. La sacarosa, en cambio, tiene el efecto opuesto sobre estos dos parámetros.

Si bien la miel y la manteca de cacao presentaron un efecto negativo sobre la firmeza y el tiempo de relajación de los rellenos, la interacción entre ambos ingredientes tiene el efecto opuesto: no sólo genera un producto más firme, sino también menos viscoso.

Se logró optimizar una formulación de rellenos dulces en donde parte de la manteca de cacao y el azúcar refinado fueron reemplazados por miel. La formulación final contenía 17,7 % de miel, 33,8 % de azúcar impalpable y 24,5 % de manteca de cacao. Este relleno presentó las características predichas por los modelos, por lo que se pudo concluir que los modelos matemáticos planteados son capaces de predecir adecuadamente el comportamiento de los atributos analizados.

El relleno diseñado con miel optimizado posee características de textura similares a las encontradas en los productos del mercado, pero fue diseñado con ingredientes naturales y no contiene ningún tipo de saborizante, aromatizante o aditivo artificial. Además, la miel incorporada a los rellenos es rica en antioxidantes naturales, por lo que este producto podría considerarse un alimento con beneficios para la salud.

- Durante 6 meses de conservación a 20 °C, la capacidad antioxidante de los rellenos con miel se mantuvo estable, no se observó oxidación lipídica y el recuento de microorganismos demostró que el producto era apto para el consumo.

La textura de los rellenos con miel y sin miel se mantuvo relativamente estable finalizados los 6 meses de conservación a 20 °C en bolsas de polipropileno. Los rellenos control presentaron una dureza mayor al finalizar el tiempo de conservación, mientras que los rellenos con miel mostraron un mayor valor de elasticidad.

Capítulo 5

Galletitas Rellenas Saborizadas



5.1 INTRODUCCIÓN

Para llevar un producto al mercado, es necesario que el mismo posea una prolongada vida útil con sus características intactas y una buena aceptabilidad.

La aceptabilidad sensorial del producto es una de las tareas más difíciles de lograr. Para mejorar el sabor de galletitas es posible incorporar distintos ingredientes a la formulación, como canela y chocolate, que además poseen capacidad antioxidante.

La canela molida es un ingrediente habitual en productos de panadería dulces, no sólo por su *flavor* y su aceptabilidad, sino también porque su actividad antimicrobiana prolonga el tiempo de vida útil de los productos (Adel y col., 2002). Por su alto contenido en antioxidantes se ha relacionado el consumo de canela con un menor riesgo de enfermedades como el cáncer y la arteriosclerosis, y ha sido utilizada como digestivo para patologías gastrointestinales (Gruenwald y col., 2010).

El cacao en polvo y el chocolate son excelentes saborizantes para productos de panadería. Particularmente el cacao en polvo, rico en flavonoides, como catequinas y epicatequinas, representa una de las materias primas con mayor presencia en la industria de las galletitas (Velásquez y col., 2014). Además, el consumo de chocolate se ha relacionado con la disminución del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Lamuela-Raventós y col., 2005).

Finalmente, la elección del envase debe ser considerada a la hora de ofrecer un producto al mercado. El packaging es la carta de presentación del producto, permite proteger al mismo de las agresiones mecánicas, de la luz, y provee una barrera contra el oxígeno y la humedad ambiente, de modo tal que productos como las galletitas tengan una vida útil mínima de 3 meses (de Dienes y Navarro, 2008). El envase es el primer contacto que tiene el consumidor con el producto, debe reflejar sus características y permitir una representación atractiva del mismo, a la vez que proporcione una imagen de calidad (Sánchez, 1994; de Dienes y Navarro, 2008).

Los envases de hojalata han sido ampliamente utilizados para conservar productos alimenticios como las galletitas. Las latas son totalmente impermeables a la luz y a la humedad, y permiten que el producto tenga una prolongada vida útil. Si bien las latas han sido mayormente reemplazadas por otros envases más económicos, su uso evoca un producto clásico y artesanal, características bien apreciadas por los consumidores (El Cronista, 2013). Además, este envase generalmente no se descarta, sino que es conservado ya sea para volver a ser relleno con galletitas o para ser utilizado con otros fines domésticos. Esto hace que las latas posean una vida útil indefinida, y se consideran una excelente alternativa para disminuir el impacto ambiental (de Dienes y Navarro, 2008).

5.2 OBJETIVOS

Evaluar la incorporación de saborizantes naturales con poder antioxidante a la formulación de galletitas. Comprobar la aceptabilidad y vida útil del producto obtenido en su envase final.

Objetivos específicos:

- Analizar la incorporación de saborizantes naturales a la formulación de las tapas de galletitas enfocándonos principalmente en su efecto sobre la capacidad antioxidante de las tapas cocidas.
- Evaluar la aceptabilidad sensorial del producto final desarrollado.
- Definir el tiempo de vida útil de la galletitas rellenas utilizando un envase adecuado.
- Comparar la calidad nutricional del producto desarrollado con productos similares encontrados habitualmente en el mercado.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Ingredientes utilizados para la preparación de galletitas rellenas

Para la preparación de galletitas se utilizó harina de trigo (Favorita 000, Molinos Río de la Plata, Buenos Aires, Argentina), almidón de maíz (Maizena, Unilever de Argentina S.A., Buenos Aires), leche en polvo descremada (SanCor, Sunchales, Santa Fe, Argentina), aceite de girasol alto oleico (Molino Cañuelas, Buenos Aires, Argentina), sacarosa (Ledesma, Jujuy, Argentina) y polvo para hornear (Royal, Kraft Foods, Argentina). Como saborizantes se utilizaron canela en polvo (Dos Anclas, Argentina) y chocolate amargo en polvo (Mapsa, Santa Fe, Argentina). Para preparar los rellenos se utilizó manteca de cacao (Callebaut®), fibra de avena (Droguería Saporiti, Argentina), azúcar impalpable (Dos Anclas®, Argentina), goma xántica (Droguería Saporiti SA, Argentina), almidón de maíz (Maizena Unilever de Argentina S.A.) y miel obtenida directamente de productores de la región Andino Patagónica.

5.3.2 Incorporación de saborizantes naturales a las galletitas

Se prepararon galletitas horneadas a 150 °C, con tal como se describe en el Capítulo 3 (sección 3.3.3.1.). A la formulación se le agregaron 2 g de canela en polvo (Dos Anclas, Argentina) o chocolate amargo (Mapsa, Santa Fe, Argentina) en polvo según correspondiera. Además se prepararon galletitas sin el agregado de saborizantes (galletitas “control”).

5.3.2.1 Contenido de antioxidantes en masas y galletitas

Se realizó una medida estimativa del incremento de la capacidad antioxidante sobre las masas y las galletitas con y sin el agregado de saborizantes. Se evaluaron los antioxidantes solubles en agua, que es el solvente más recomendado en la bibliografía para muestras con productos de Maillard y compuestos fenólicos (Budryn y col., 2009).

Se extrajeron los compuestos antioxidantes solubles en agua por la técnica de Morales y col. (2009) con pequeñas modificaciones. Las muestras de galletitas se molieron (Molinillo de Café Eléctrico Peabody Pe-mc9103, China) y tamizaron (500 µm). En este caso las masas no fueron liofilizadas ya que podían ser dispersadas en el solvente.

Se pesaron 0,2 g de muestra (masa o galletita) y se les agregaron 1,5 ml de agua a 45°C. Luego de 5 minutos de agitación a 1000 rpm las muestras se enfriaron por media hora a 4°C. El extracto se centrifugó durante 10 min a 10.000 x g a 4 °C (5415 R Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se recogió y se realizaron dos extracciones adicionales utilizando 1 ml y luego 0,5 ml de agua destilada a 45 °C. Los sobrenadantes se juntaron, se los

filtró utilizando un filtro de acetato de celulosa (0,45 μm de poro, Osmonics, USA) y se los guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis. Sobre los sobrenadantes obtenidos se determinó el contenido de antioxidantes mediante las técnicas de FRAP y DPPH descriptas en la sección 3.3.3.5, más recomendadas que la técnica de ABTS para determinar capacidad antioxidante en galletitas (sección 3.5). También se determinó el contenido de fenoles totales mediante la técnica de Folin descrita en el Capítulo 4, sección 4.3.2.7.

Los resultados se compararon con los obtenidos para una galletita sin el agregado de los saborizantes, y se expresaron como porcentaje (%) de aumento en la capacidad antioxidante, o de contenido de compuestos fenólicos totales. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

5.3.3 Producto final

Una vez definido el saborizante a utilizar se procedió a preparar el producto final: galletitas rellenas saborizadas, sobre las que se realizaron ensayos de aceptabilidad y vida útil.

La formulación final de las tapas de galletitas fue: 35 g de harina de trigo, 25 g de almidón de maíz, 20 g de leche en polvo descremada, 12,5 g de azúcar, 0,9 g de polvo para hornear, 10 g de aceite, 25 ml de agua potable y 2 g de canela (el saborizante seleccionado). Las masas se prepararon tal como se describe en la sección 3.3.3.1. Las galletitas se cortaron en círculos de 3 cm de diámetro, y se hornearon a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos para obtener un producto final con una humedad menor al 12 % (determinada de acuerdo a la técnica descrita en el capítulo 3, sección 3.3.2.4). El proceso completo se puede observar en la Figura 5.1.

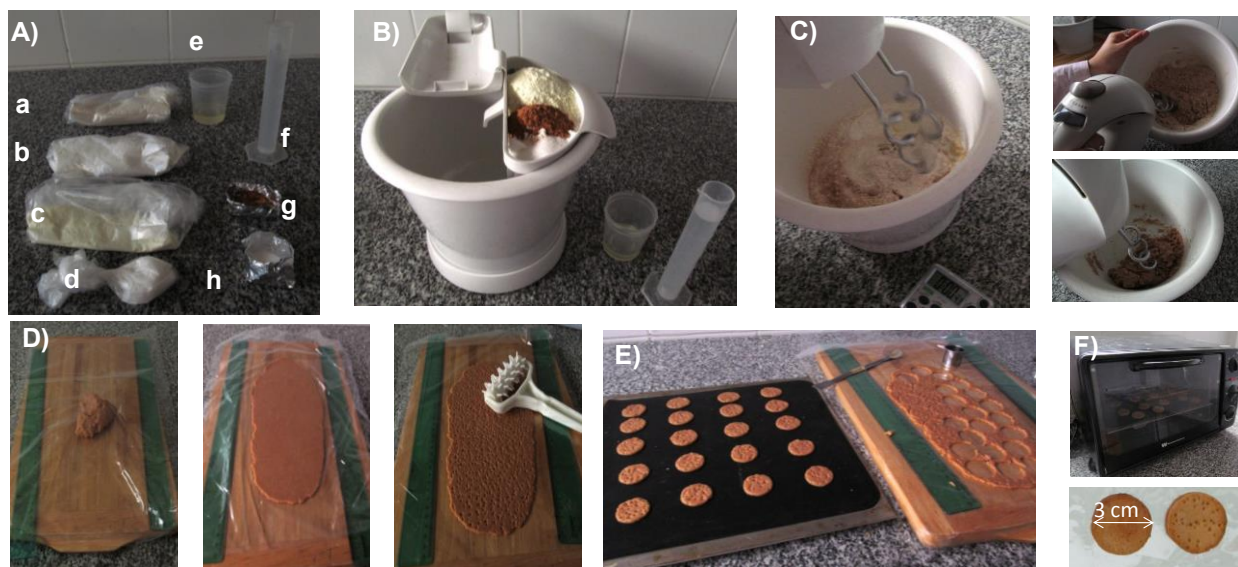


Figura 5.1. Preparación de galletitas. (A) Los ingredientes (harina (a), maicena (b), leche en polvo descremada (c), azúcar (d), aceite de girasol alto oleico (e), agua potable (f), canela en polvo (g) y polvo para hornear (h)) fueron pesados y acomodados en la mesada de trabajo. (B) Los ingredientes secos fueron tamizados. (C) Se incorporó primero el aceite y luego el agua mezclando constantemente con el utensilio formador de masa de la batidora. (D) Una vez obtenida la masa se la estiró en una bolsa de polipropileno y se pinchó. (E) Con un cortapasta circular se cortaron las masas y se las ubicó sobre una placa de silicona. (F) Las masas se hornearon a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min hasta obtener las tapas que se dejaron enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente.

Luego de obtener las galletitas se procedió a preparar los rellenos de acuerdo a la formulación optimizada obtenida en el capítulo 4 (sección 4.4.2.3). Los ingredientes fueron pesados y la manteca de cacao termostatizada a 45 °C. Una vez fundida la fase grasa, se incorporó el resto de los ingredientes y se homogenizó manualmente por aproximadamente 2 min, hasta obtener una pasta moldeable. Se colocó 1,6 g de relleno sobre la cara lisa de la galletita y se ubicó la otra galletita en la parte superior. Las tapas se presionaron ligeramente hasta obtener el producto final. El proceso completo puede observarse en la Figura 5.2.

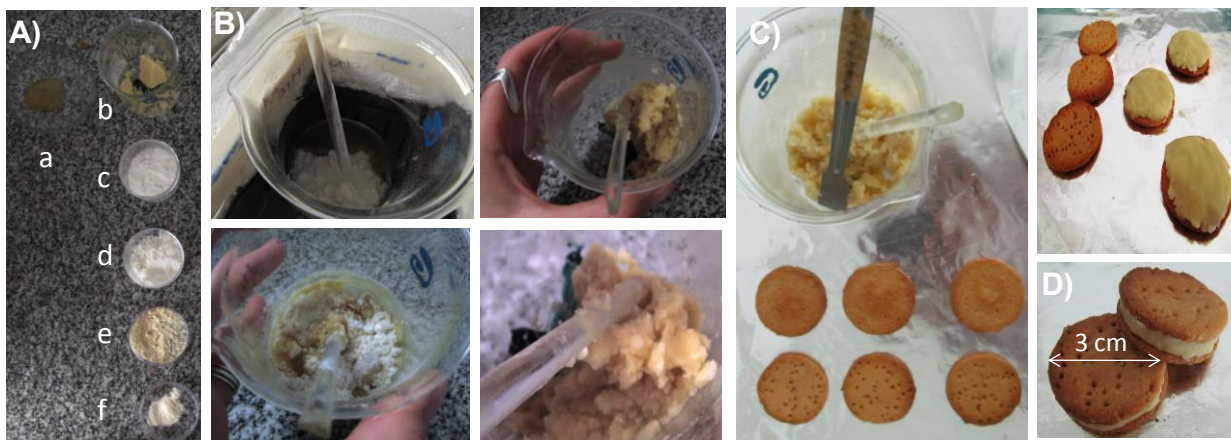


Figura 5.2. Preparación de galletitas rellenas. (A) Ingredientes utilizados: (a) miel, (b) manteca de cacao, (c) almidón (d) azúcar impalpable, (e) fibra de avena y (f) goma xántica. (B) Una vez fundida la manteca de cacao se incorporó el resto de los ingredientes y se homogenizó manualmente con una varilla. (C) Se acomodaron las galletitas de canela recién preparadas y se colocó el relleno sobre la parte lisa. (D) Se colocó la otra galletita como tapa y se presionó ligeramente para obtener el producto final que se puede observar en la última imagen

5.3.3.1 Análisis sensorial del producto

El análisis sensorial es sumamente importante para definir la aceptabilidad de un producto; a diferencia del análisis instrumental cubre todos los sentidos y permite el nexo entre el laboratorio y el mundo de los consumidores (DESA, 2010). Esta herramienta permite evaluar los alimentos haciéndolos de esta manera competitivos en el mercado (Hernández, 2005).

Considerando el relleno con miel como un producto que podría reemplazar a los rellenos habitualmente encontrados en el mercado (rellenos “control” sin miel), uno de los objetivos del análisis sensorial fue buscar la preferencia o el rechazo del producto mediante el empleo de preguntas dirigidas a atributos particulares. Para ello se realizó una evaluación de aceptabilidad por atributo. Se utilizó una escala hedónica estructurada para medir la aceptabilidad de los atributos seleccionados (en este caso, color, sabor, textura y aceptabilidad general).

También se determinó la percepción de los evaluadores acerca de qué tan saludables consideraban a las galletitas rellenas. Para esto se utilizó una escala no estructuradas que iba desde “Muy poco saludables” a “Muy saludables” (Baixauli y col., 2008).

Finalmente se incluyó una prueba de intención de compra y consumo que permitió evaluar si los consumidores seleccionaban el relleno control (sin miel) por sobre el relleno con miel. Por la forma en la que se estructuró el cuestionario, esta comparación les permitía a los consumidores indicar que “no preferirían ningún producto” o que “preferirían cualquiera de dos”, es decir que no se forzaba a la elección de un producto sobre el otro (DESA, 2010).

Para el análisis sensorial se prepararon galletitas saborizadas con canela rellenas con el relleno con miel o sin miel (control) (Figura 5.3).

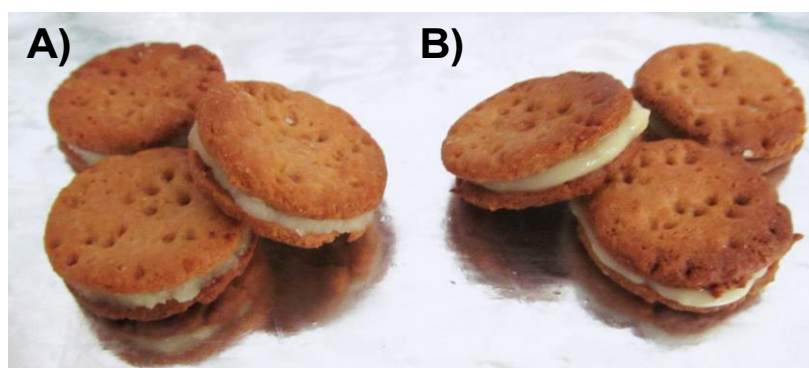


Figura 5.3. Galletitas dulces saborizadas rellenas con relleno (A) con miel y (B) sin miel

Las dos muestras obtenidas fueron codificadas con 3 dígitos no consecutivos obtenidos al azar (145 para galletita con relleno control, cuya formulación correspondía a la formulación 5 Tabla 4.2; y 362 para galletita con relleno con miel). Las muestras se presentaron a evaluadores no entrenados en una bandeja de plástico que contenía además un vaso de agua como neutralizante y caramelos como recompensa (Figura 5.4). El orden de presentación de las muestras se aleatorizó de modo que no influyera en los resultados: la mitad de los evaluadores recibió las muestras en el orden 145-362, mientras que la otra mitad en el orden 362-145.



Figura 5.4. Disposición de la bandeja entregada a los evaluadores

Los evaluadores fueron 42 hombres y mujeres de entre 18 y 30 años. Este grupo de consumidores es adecuado para este tipo de análisis, ya que presentan una alta tasa de consumo y sus hábitos y lealtades hacia ciertas marcas y sabores se encuentran en desarrollo (DESA, 2010). Los evaluadores fueron reclutados a las 11 de la mañana en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata. A los evaluadores se les explicó el ensayo, se les consultó si les agradaba el sabor a canela y se les entregaron las muestras junto con la planilla a completar que puede observarse en la Figura 5.5.

PANEL SENSORIAL DE RELLENOS DE GALLETITAS DULCES

Nombre:.....Edad:..... Evaluador N°.....

Usted ha recibido 2 muestras de rellenos de galletitas. Utilizando la escala indicada, por favor evalúe cada atributo marcando con una cruz (x) en el casillero adecuado. Enjuáguese la boca con agua entre muestra y muestra.

Muestra N° 145	<i>Me disgusta</i>								<i>Me gusta</i>
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Textura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Muestra N° 362	<i>Me disgusta</i>								<i>Me gusta</i>
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Textura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Qué tan saludable cree que son estos productos?

Muy Poco Saludables
Medianamente Saludables
Muy Saludable

Por favor, responda a las siguientes preguntas

¿Consumiría alguno de estos productos? _____

¿Compraría alguno? _____

¿Cuál? _____

¡Muchas gracias por su colaboración!

Figura 5.5. Planilla presentada a los panelistas para realizar la evaluación sensorial de las galletitas rellenas

5.3.3.2 Conservación de las galletitas rellenas

Como envase se utilizaron cajas de metal (hojalata) de 16 cm de diámetro por 7 cm de alto. Este material es completamente impermeable al oxígeno, a la humedad y a la luz; además, al ser un envase reutilizable se considera no contaminante para el medio ambiente (INTI, 2012; CAA, 2013^b), y está habilitado por el CAA para su uso en galletitas: de acuerdo al Artículo 196 - (Res 4485, 23.09.91) "Queda permitido el empleo de envases de retorno de vidrio, sifones de materia plástica y de hojalata para galletitas".

Para el ensayo de conservación se acomodaron 14 galletitas por cada lata, tal como se puede apreciar en la Figura 5.6.



Figura 5.6. Disposición de las galletitas en el envase final para el ensayo de conservación

Las galletitas se colocaron sobre “pirotines” de papel para evitar su contacto directo con la superficie metálica. Las latas se cerraron con una tapa tipo “sombbrero” y las galletitas se conservaron a 20 °C durante 7 meses. Cada 4 o 5 semanas se tomaron muestras de la galletita y de su relleno y se determinó la actividad acuosa de ambos, tal como se describe en la sección 3.3.2.3.

La textura de las galletitas rellenas se determinó al inicio del ensayo de conservación, y a las 5, 26 y 30 semanas. Para esta prueba se realizó un ensayo de compresión con una sonda Volodkevich Bite Jaws, que simula la acción de morder y cortar la muestra con los dientes incisivos. Del gráfico obtenido (Figura 5.7) se pueden obtener los distintos parámetros relacionados a la textura del producto.

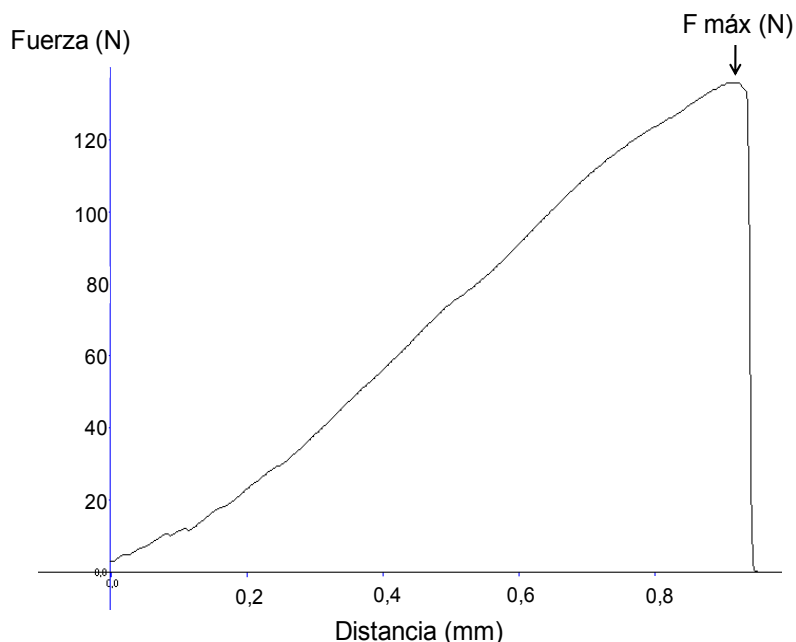


Figura 5.7. Gráfico de Fuerza (N) en función de distancia (mm) obtenido mediante un ensayo de ruptura de galletitas utilizando una sonda Volodkevich Bite Jaws

Del gráfico de fuerza (N) en función de la distancia (mm) se obtuvo la fuerza máxima (N), que se relaciona con la dureza de la muestra, y el área debajo de la curva, que se asocia con la energía requerida para cortar la galletita (Doporto, 2014). Se realizaron ocho repeticiones para cada muestra. Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: velocidad de ascenso y descenso pre-ensayo y post-ensayo: 5 mm/s, velocidad del ensayo: 0,5 mm/s, y porcentaje de compresión de la muestra: 20 %.

Los valores obtenidos de dureza ($F_{Máx}$) y área bajo la curva se compararon con los obtenidos en las siguientes galletitas dulces comerciales: Pitusas sabor limón (3,3 x 1,4 cm), Oreo Golden con relleno sabor vainilla (4,2 x 1,4 cm), Maná rellenas sabor vainilla (5,0 x 1,2 cm), Merida mini vainilla (3,2 x 1,5 cm) y Rumba Halloween (5,4 x 4,0 x 1,26 cm). Todas las galletitas eran circulares a excepción de Rumba que era rectangular. Las medidas están dadas en función del diámetro x espesor, o largo x ancho x espesor, según sean galletitas circulares o rectangulares.

5.3.3.3 Valor nutricional y composición del producto final

Se realizó una estimación teórica del valor nutricional de las galletitas rellenas considerando la cantidad de galletita (3,33 g) y de relleno (1,6 g) que contenía el producto final,

el aporte de macro componentes de cada uno de los ingredientes, la humedad de los rellenos y de las galletitas, y los resultados obtenidos en el capítulo 3, sección 3.4.3.1.

Para estimar el contenido de lípidos totales saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en las galletitas rellenas se consideró el aporte porcentual de las dos fases grasas principales en las galletitas (aceite de girasol alto oleico y manteca de cacao). Luego se utilizaron los resultados del perfil de ácidos grasos de las galletitas obtenidos en el capítulo 3 (Tabla 3.9, sección 3.4.4) y se evaluó el perfil de ácidos grasos de la manteca de cacao por cromatografía gaseosa, de la misma manera que se describe en la sección 3.3.5.3.

Estos valores se compararon con los encontrados en galletitas rellenas del mercado. Se seleccionaron aleatoriamente 8 tipos distintos de galletitas para la comparación.

5.3.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para los ensayos realizados durante el tiempo de conservación se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANAVA) bifactorial o monofactorial según correspondiera, seguido por un ensayo LSD para determinar qué valores presentaban diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Si únicamente se realizó la comparación de algún parámetro entre dos muestras se utilizó una prueba T de student para muestras independientes; esta herramienta permite la comparación de medias (esperanzas) en dos poblaciones (distribuciones). Para este análisis se consideró un ensayo bilateral (prueba de dos colas), ya que no se podía predecir el sentido de la diferencia (Balzarini y col., 2008, DESA, 2010). Se consideró un nivel de significación del 5%.

Cuando se analizó la intención de compra sobre el las galletitas con relleno con miel o sin miel las respuestas “compraría ambos” se dividieron en partes iguales a favor de cada uno de los productos. Luego se utilizaron tablas de doble entrada, que definen el mínimo número de respuestas necesarias para concluir si existen diferencias significativas en la intención de compra de alguno de los dos productos. Si el número de respuestas para alguna de las 2 formulaciones era superior al valor fijado por tabla, se podría decir que existen diferencias entre las muestras al nivel seleccionado (en este caso se también seleccionó un nivel de significación del 5%) (Sosa, 2011; DESA, 2010).

Para comparar los valores de Kcal y lípidos, grasas saturadas, proteínas y fibra entre las galletitas desarrolladas y las encontradas en el mercado, se utilizó una prueba T de student para una muestra, que permite contrastar si la media de una población (en este caso, las galletitas comerciales) difiere significativamente de un valor dado (las galletitas desarrolladas) (Balzarini y col., 2008).

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Capacidad antioxidante de galletitas saborizadas

En el capítulo 3 quedó demostrado que las masas de galletitas poseen una alta capacidad antioxidante, producto de fenoles y otros compuestos presentes en los ingredientes de la formulación como podrían ser péptidos cortos. Luego, al ser horneadas, parte de estos compuestos son degradados por el tratamiento térmico, pero son reemplazados por otros antioxidantes derivados de la reacción de Maillard.

La canela y el chocolate son saborizantes naturales con una importante capacidad antioxidante. Estos compuestos bioactivos se extrajeron tanto en galletitas como en masas tal como se describió en la sección 5.3.2.1. Luego se evaluó el incremento o disminución en la capacidad antioxidante de las masas y galletitas que genera la incorporación de estos ingredientes a la formulación, al compararla con una formulación sin saborizantes. Los resultados se pueden observar en la Tabla 5.1

Tabla 5.1 Diferencia en la capacidad antioxidante (determinada con las técnicas de FRAP y DPPH) y contenido de fenoles totales (CFT) en masas y galletitas saborizadas con canela o chocolate

	Masa	
	Canela	Chocolate
DPPH (%)	338 ± 83 ^a	414 ± 57 ^b
FRAP (%)	267 ± 15 ^a	364 ± 9 ^a
CFT (%)	87 ± 2 ^b	58 ± 1 ^a
	Galletita	
	Canela	Chocolate
DPPH (%)	146 ± 30 ^b	43 ± 10 ^a
FRAP (%)	9 ± 3 ^a	23 ± 6 ^a
CFT (%)	11 ± 1 ^b	-13 ± 5 ^a

Los valores informados corresponden a las medias ± las desviaciones estándar. Superíndices iguales para los mismos pares de datos indican que las medias no se diferencian significativamente ($P > 0,05$).

La incorporación de canela y chocolate a la formulación de las galletitas generó un importante incremento en la capacidad antioxidante de las masas, independientemente de la técnica utilizada (DPPH o FRAP). Además, según los resultados del ensayo de Folin, la canela aportaría un mayor contenido de compuestos fenólicos totales ($P \leq 0,05$). A pesar de esto, el chocolate resultó ser el saborizante que generó el mayor incremento en el contenido de

antioxidantes determinado por las técnica de DPPH en las masas ($P \leq 0,05$), mientras que no se observaron diferencias significativas mediante el ensayo de FRAP ($P > 0,05$).

En el producto horneado la actividad antioxidante también se vio aumentada por la presencia de chocolate o canela; sin embargo, este aumento fue más moderado que el observado en las masas. Esto puede deberse a que una parte de los compuestos fenólicos presentes en los saborizantes podría descomponerse por el tratamiento térmico. Por otro lado, a pesar de que el chocolate haya mostrado incrementar más la capacidad antioxidante de las masas que la canela, las galletitas con canela fueron las que mostraron el mayor incremento en la capacidad antioxidante cuantificada mediante la técnica de DPPH ($P \leq 0,05$) (Tabla 5.1). Probablemente porque los compuestos fenólicos del chocolate serían menos estables que los de la canela (Tabla 5.1). Nuevamente no se encontraron diferencias significativas en el poder antioxidante de las galletitas mediante la técnica de FRAP ($P = 0,089$).

Los resultados de Maheshwari (2016) ya habían demostrado la pérdida de la capacidad antioxidante de la canela por el tratamiento térmico. Por otro lado, las catequinas y epicatequinas del chocolate son también termolábiles y su contenido puede disminuir con el horneado; además, este tratamiento puede modificar el perfil de polifenoles de este producto (McShea y col., 2008). De todas formas, es claro que la incorporación de canela o chocolate incrementa el contenido de antioxidantes en las galletitas. Esto podría deberse a varios factores: en primer lugar es posible que los antioxidantes que aportan estos saborizantes no sean completamente degradados por el tratamiento térmico, o bien que la presencia de estos ingredientes permita la formación, vía reacción de Maillard, de nuevas estructuras que igualmente incrementen el poder antioxidante de las galletitas.

En conclusión, tanto la canela como el chocolate incrementaron la capacidad antioxidante de las galletitas. Sin embargo, se seleccionó la canela para continuar con los ensayos, ya que fue la que mostró mejores resultados en el aumento de la capacidad antioxidante del producto final, y porque los consumidores relacionan más el consumo de canela con una dieta saludable que el consumo de chocolate. De acuerdo al trabajo publicado por Crofton y col. (2013), si bien un sector de los consumidores de “snacks saludables” consideraba que el chocolate podría incorporarse en la formulación, otro sector consideraba que un producto saludable no debería contener chocolate. En cambio, según esta bibliografía, la gran mayoría de los encuestados percibía que la canela era un saborizante adecuado para la dieta por sus beneficios a la salud.

5.4.2 Análisis sensorial de galletitas rellenas saborizadas

Los resultados indicaron que no existían diferencias significativas en la preferencia en relación al color, sabor, textura o aceptabilidad general de los rellenos ensayados en las galletitas con rellenos con miel y sin miel (en todos los casos $P > 0,05$). Los resultados de las frecuencias relativas obtenidas para cada atributo pueden verse en la Figura 5.8.

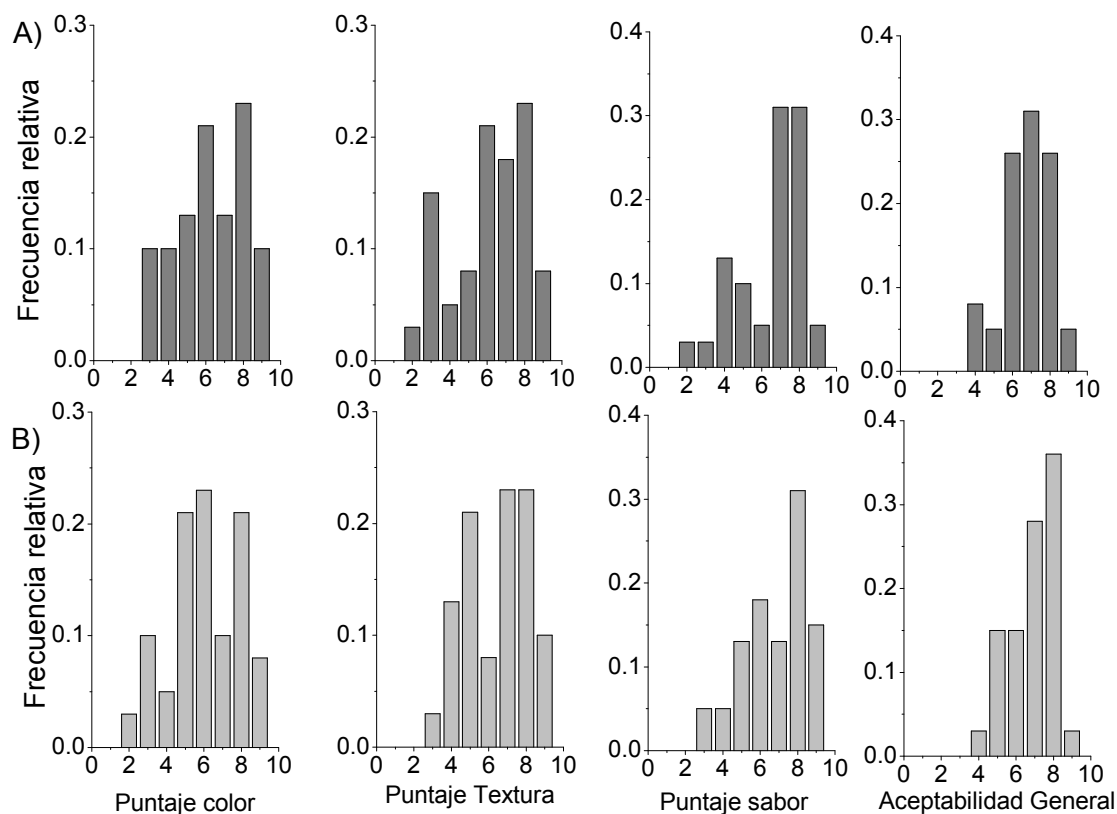


Figura 5.8. Frecuencia relativa de respuestas obtenidas de panelistas no entrenados para diferentes atributos (color, sabor, textura y aceptabilidad general) de galletitas rellenas con una crema sin miel (A) (relleno control) y con miel (B)

Al observar el histograma del puntaje obtenido para el color de los rellenos, se puede ver que los rellenos control, obtuvieron mayores puntajes que los rellenos con miel. Sin embargo, una alta proporción de los encuestados (casi un 50 %) dieron puntajes de sabor entre 8 y 9 para los rellenos con miel, mientras que para los rellenos sin miel esta proporción no alcanzó el 40 %. Finalmente, en cuanto a la aceptabilidad general, se pudo ver que el 39 % de los encuestados informó valores entre 8 y 9 para los rellenos con miel, mientras que en las galletitas control, el 31 % de los evaluadores indicaron estos altos valores de aceptabilidad general.

Al analizar las distribuciones de las frecuencias relativas encontradas para cada atributo, se puede ver que la textura y el color no presentaron distribuciones definidas. Por otro lado, al analizar el histograma obtenido para el parámetro “sabor” de las dos galletitas evaluadas, se puede observar que para ambas muestras los histogramas presentan distribuciones asimétricas, con una mayor cantidad de respuestas positivas (valores superiores a 7). La aceptabilidad general de las galletitas rellenas sin miel mostró una distribución más simétrica, con un máximo para valores de aceptabilidad general entre 6 y 8 puntos. El histograma de las galletitas con relleno con miel, en cambio, mostró que una forma más asimétrica, con un máximo en valores de aceptabilidad general entre 7 y 8 puntos.

Se podría concluir entonces que, por la distribución que presentan los histogramas obtenidos, los rellenos con miel tendrían una buena aceptación en el mercado, ya que su aceptabilidad no se diferencia significativamente de un relleno sin miel. Además, al comparar los histogramas, se puede observar que una mayor cantidad de evaluadores dieron mayores puntajes a los rellenos con miel que al control en cuanto a su sabor y aceptabilidad general, a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas entre los parámetros ($P > 0,05$).

Por otro lado, la intención de consumo y compra de las galletitas rellenas fue muy alta, tal como se puede observar en la Figura 5.9.

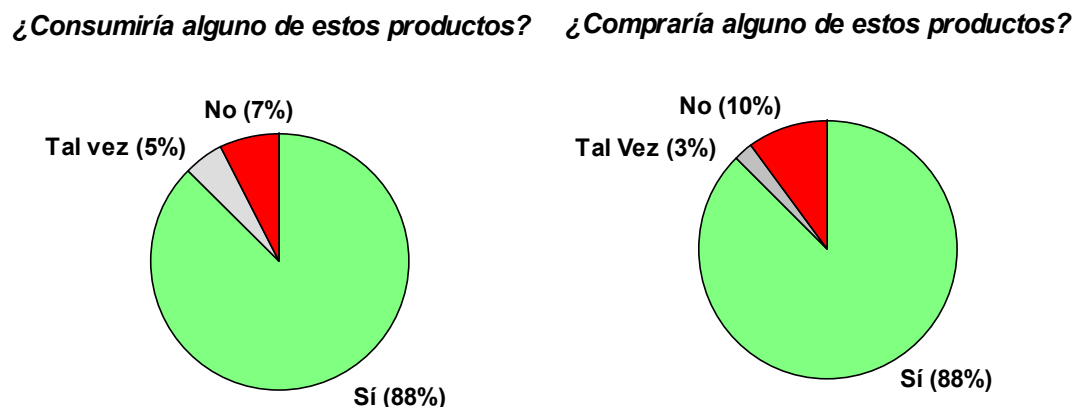


Figura 5.9. Intención de compra y de consumo de galletitas rellenas de los evaluadores encuestados

El 88 % de los encuestados informó que consumirían estos productos, un 5 % tal vez lo consumiría y sólo un 7 % no lo consumiría. Es interesante destacar que en cuanto a intención de compra, todos los evaluadores que habían informado que consumirían los productos también los comprarían, mientras que una fracción de quienes informaron que “tal vez lo consumirían”, no los comprarían, y es por esto que el porcentaje de evaluadores que no comprarían este producto ascendió a un 10 %. Mediante este estudio se pudo comprobar que el consumo/compra de galletitas rellenas es muy alto en este grupo de consumidores entre 18 y

30 años. Esto coincide con los estudios previos realizados por el Departamento de Desarrollo Productivo y Tecnológico de la Universidad Nacional de Lanús, que fue llevado a cabo durante los meses de mayo y junio del 2016, en donde participaron más de 800 personas de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la Región Metropolitana. Dicho estudio reveló que nueve de cada diez personas consumen productos dulces a diario, y los preferidos (tanto por hombres como por mujeres) son las galletitas (<http://www.infobae.com...>, 2013). En cuanto a qué tan saludable consideraban el producto, resultó sorprendente que, sin haber informado nada sobre la composición de las galletitas, los evaluadores consideraran a estos productos como “muy saludables” (para ambos valores la media fue superior a los 6,7 puntos). Sin embargo, sí se les consultó a los evaluadores si a ellos les agradaba el sabor a canela antes de realizar el ensayo. Es probable que esto haya influido en la respuesta de los consumidores, ya que la canela es un ingrediente con conocidos beneficios para la salud.

Finalmente, se les consultó a los evaluadores cuál galletita comprarían. Si bien no se encontraron diferencias significativas en la preferencia de compra de ninguno de los dos productos, la tendencia a comprar las galletitas rellenas con miel fue levemente superior a la de las galletitas control (Figura 5.10).

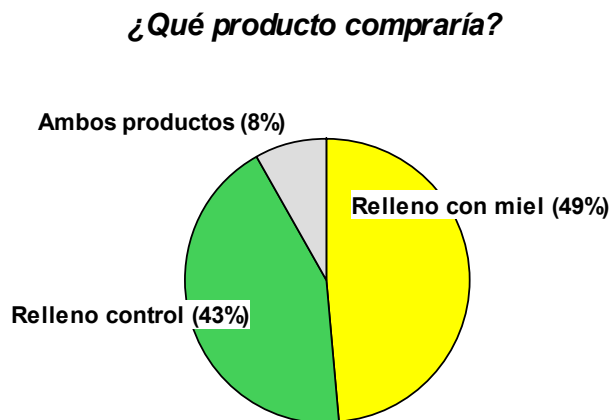


Figura 5.10. Preferencia de compra de las galletitas rellenas con y sin miel

Se podría concluir entonces que la galletita saborizada con canela, a la que se incorporó el relleno con miel desarrollado en el capítulo 3, presentaba una excelente aceptabilidad y una alta intención de consumo.

5.4.3 Tiempo de conservación en el envase final

Durante el tiempo de conservación la actividad acuosa aumentó significativamente, tanto para los rellenos como para las tapas de galletitas (Figura 5.11).

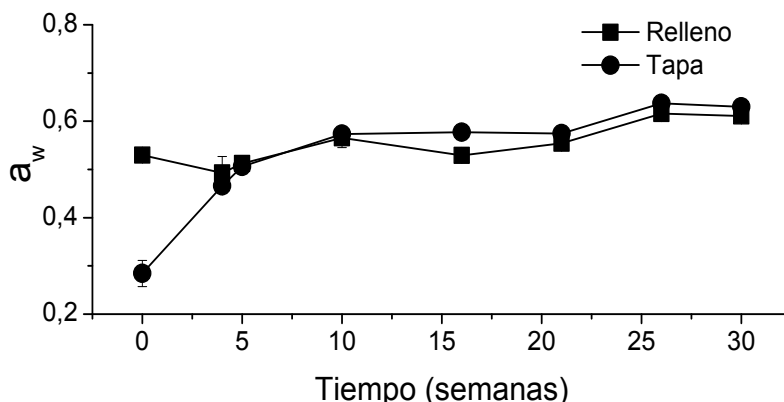


Figura 5.11. Evolución de la a_w en tapas y rellenos de galletitas rellenas guardadas en lata a 20°C. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

A lo largo de 7 meses de almacenamiento, la a_w tanto de los rellenos como de las tapas se mantuvo en valores inferiores a 0,65, por lo que se puede asegurar una adecuada estabilidad microbiológica (capítulo 4, sección 4.4.3.4). Al comparar la evolución de la a_w de los rellenos y de las tapas en el producto final, se puede ver que ésta es más compleja que las encontradas para los rellenos y las galletitas conservadas individualmente en los capítulos anteriores (Figuras 4.15 y 3.20, respectivamente). Al inicio del ensayo la actividad acuosa de las tapas era significativamente inferior a la de los rellenos ($0,28 \pm 0,03$ y $0,53 \pm 0,01$, respectivamente). Esta diferencia hizo que entre las 0 y las 4 semanas el agua inevitablemente difundiera desde el relleno hacia las tapas, aumentando la actividad acuosa de las mismas, mientras que la a_w del relleno disminuyó levemente ($P \leq 0,05$). Luego se alcanzó el equilibrio entre las tapas y el relleno, y a partir de ese momento la actividad acuosa del producto se mantuvo estable hasta las 20 semanas de conservación ($P > 0,05$). A las 26 semanas se observó un incremento en la actividad acuosa tanto de los rellenos como de las tapas de galletitas, esto probablemente se deba a la absorción de la humedad ambiente. Si bien las latas son impermeables al vapor de agua, las tapas tipo “sombbrero” utilizadas no proporcionan un cierre totalmente hermético y el producto puede absorber humedad. Luego, entre las 26 y las 30 semanas no se observó un aumento en la actividad acuosa del producto ($P > 0,05$).

Acompañando estos resultados, en la Figura 5.12 se puede observar la textura de las galletitas al inicio, a las 5 semanas, a las 26 y a las 30 semanas de conservación.

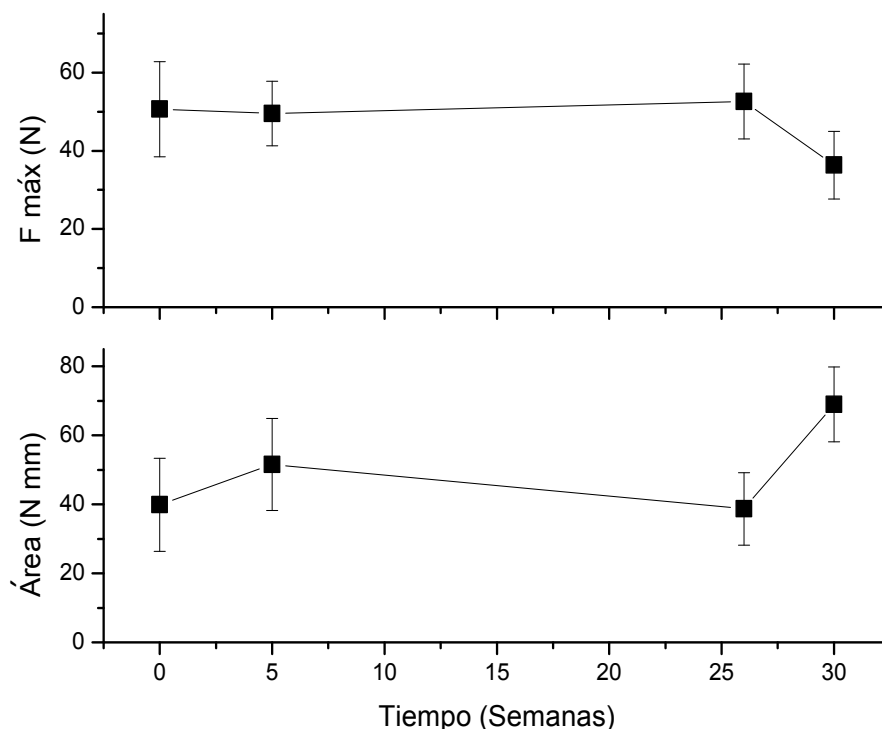


Figura 5.12. Dureza ($F_{\text{máx}}$) y área bajo la curva de galletitas rellenas con miel a distintos tiempos de conservación. Las líneas verticales indican las desviaciones estándar

Se encontraron diferencias significativas en la textura de las galletitas rellenas a lo largo de su tiempo de conservación. En la Figura 5.12 se pueden observar la evolución de la dureza ($F_{\text{máx}}$) y el área bajo la curva (relacionada con la energía necesaria para romper el producto) obtenidas para las galletitas a distintos tiempos de conservación. No se encontraron diferencias significativas ni en la dureza y ni en el área bajo la curva hasta superados los 6 meses de almacenamiento ($P > 0,05$). Es interesante destacar que, a pesar de la difusión de humedad desde el relleno hasta las tapas entre las 0 y las 5 semanas de conservación, esto no modificó la textura del producto. Esto probablemente se deba a que, si bien la actividad acuosa de las tapas aumentó, su valor se mantuvo por debajo de las 0,6 unidades, lo que aseguraría una textura estable de todo el producto. La textura de las galletitas siguió sin cambios hasta superadas las 25 semanas de conservación; luego la dureza disminuyó significativamente, acompañada de un aumento en la energía necesaria para romper el producto ($P \leq 0,05$). A partir de estos resultados se pudo concluir que en el envase final seleccionado la textura de las galletitas se mantiene estable y con una a_w inferior a 0,65 hasta por 6 meses.

Estos valores se compararon con medidas de textura realizadas sobre galletitas comerciales (Pitasas sabor limón, Oreo Golden con relleno sabor vainilla, Maná rellenas sabor

vainilla, Merida mini vainilla y Rumba Halloween). Los resultados se pueden observar en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Textura de galletitas rellenas comerciales

Muestra	Fuerza (N)	Área (N mm)
Galletita comercial Pitusas relleno sabor limón	32,0 ± 2,7 ^b	63,8 ± 19,4 ^a
Galletita comercial Oreo Golden con relleno sabor vainilla	21,5 ± 4,1 ^a	50,1 ± 17,6 ^a
Galletita comercial Maná rellenas sabor vainilla	24,7 ± 3,8 ^a	126,6 ± 83,6 ^b
Galletita comercial Merida mini vainilla	31,0 ± 2,7 ^b	52,5 ± 7,7 ^a
Galletita comercial Rumba Halloween	25,0 ± 4,5 ^a	49,9 ± 10,0 ^a

Los valores informados corresponden a las medias ± las desviaciones estándar. Superíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente ($P > 0,05$).

Si bien se encontraron diferencias significativas en la textura de las galletitas comerciales, al observar los datos se puede observar una tendencia general: las galletitas comerciales resultaron más blandas que las galletitas rellenas desarrolladas en este trabajo de tesis. Tal como se indicó el capítulo 4 (sección 4.4.2.3), los rellenos evaluados mostraron ciertas diferencias con los rellenos comerciales: presentaron menor firmeza, elasticidad y menores tiempos de relajación al compararlos con los resultados obtenidos por Battaiotto y col. (2013) en rellenos de galletitas habitualmente comercializadas en Argentina. Asimismo, las tapas de galletitas preparadas en este trabajo se podrían clasificar como “semidulces” por su bajo contenido de azúcar y lípidos (Manley, 2000). En cambio, las tapas de las galletitas comerciales contienen en general un alto contenido de lípidos, lo que genera un producto final más fácilmente fracturable (Maache-Rezzoug y col., 1998). Por otro lado, el alto contenido de azúcar en las galletitas comerciales también hace que el producto final sea más frágil, ya que limita la formación de una red continua de gluten (Maache-Rezzoug y col., 1998). A pesar de estas diferencias en la textura, y considerando los resultados obtenidos en el panel sensorial, se podría concluir que las galletitas rellenas desarrolladas presentarían una textura aceptable para los consumidores.

5.4.4 Valor nutricional y composición del producto final

El cálculo de la composición de las galletitas rellenas se realizó tal como se describe en la sección 5.3.3.3, se consideró a la goma xántica como un polisacárido no celulósico resistente a la digestión (Olivares y Zacarías, 2013).

La composición de las galletitas rellenas obtenidas se comparó con galletitas de características similares encontradas habitualmente en el mercado. Los resultados se pueden observar en la Tabla 5.3.

Capítulo 5
Galletitas rellenas saborizadas

Tabla 5.3. Composición porcentual de las galletitas rellenas desarrolladas en este trabajo y de galletitas encontradas en el mercado (Galletitas dulces Oreo Golden con relleno sabor vainilla, Mana rellenas sabor Vainilla, Rumba rellenas, Pitusas sabor limón, Pepas Carrefour rellenas con dulce de membrillo, Pepitos con relleno de vainilla, Tentaciones Mousse sabor chocolate, Oreo rellenas bañadas con chocolate blanco*)

Valores expresados por cada 100 g de producto	Galletitas rellenas con miel	Oreo golden	Mana rellenas sabor vainilla	Rumba Halloween rellenas	Pitusas sabor limón	Pepas Carrefour®	Tentaciones Mousse de chocolate	Pepitos rellenas sabor Vainilla	Oreo rellenas bañadas con chocolate blanco
Kcal	439,9	490	464	492,9	473,3	481	482	495	535
Carbohidratos	72,3	66,67	72	67,86	68	63	63	67	58,8
de los cuales azúcares	31,7	33,33	NI	29,64	NI	NI	NI	37	44,11
Proteínas	7,49	5,33	6,8	7,149	5,67	6	8	5,5	6,76
Lípidos totales	13,4	22	17,2	17,9	20,0	23	22	22	29,4
Saturadas	5,1	7,66	8,4	8,5	9,3	10	11	12	17,35
Monoinsaturadas	7,5	11,66	7,2	7,5	6	NI	8,7	NI	10,3
Poliinsaturadas	0,82	2,33	0	0	NI	NI	1	NI	1,76
Fibra	3,17	1,33	2,4	2,86	2	2,3	3,1	2	0

*Fuente: Rótulo nutricional o [http://www.nutrinfo.com/...](http://www.nutrinfo.com/)

NI = No informado

Se puede observar en la Tabla 5.3 que el producto final obtenido presenta un menor aporte de Kcal totales, un mayor contenido de proteínas, fibra e hidratos de carbono, un menor contenido de lípidos y un menor aporte de grasas saturadas. Los valores de estos componentes en las galletitas rellenas con miel fueron significativamente diferentes a los de las galletitas comerciales analizadas ($n = 8$) (p - val de; 0,0003; 0,0128; 0,0114; 0,0026; 0,0005 y 0,0016 para contenido de Kcal, proteínas, fibra, hidratos de carbono, lípidos y grasas saturadas).

5.4.4.1 Rótulo

El capítulo V del código Alimentario Argentino (CAA) describe las “Normas Para la Rotulación y Publicidad de los Alimentos” (CAA, 2013^b). Para los alimentos envasados se debe incluir en el rótulo la siguiente información: denominación de venta, lista de ingredientes, contenidos netos, fecha de duración.

- Denominación de venta:

Es el nombre específico y no genérico que indica la verdadera naturaleza y las características del alimento. El producto final desarrollado en este trabajo de tesis corresponde a una galletita dulce tipo rellena. Como los rellenos contienen miel, sería posible incluir esta información en su rótulo. Aunque actualmente en el CAA no existe un apartado en donde especifique la cantidad mínima que debería contener un relleno de galletita dulce para definirlo como “relleno con miel”, sí existe normativa para turroneos: “En los casos en que obligadamente no corresponda el empleo de miel y se utilizara como edulcorante nutritivo, siempre que su cantidad no sea inferior al 25,0 % del total de los edulcorantes, podrá añadirse a la denominación que le corresponda la frase “*Con miel*”. Como en los rellenos desarrollados, el 34% de los edulcorantes nutritivos es miel, podría considerarse que el término “galletitas rellenas saborizadas con canela, con relleno con miel” sería posible.

- Lista de ingredientes:

Según el capítulo V del CAA, en la lista de ingredientes todos ellos deberán enumerarse en orden decreciente de peso inicial. Además, explicita que todos los tipos de sacarosa deben rotularse con el nombre genérico de “sacarosa”. Los aditivos alimentarios también se deben incluir en la lista de ingredientes. Según el CAA “Un aditivo, es cualquier ingrediente agregado a los alimentos intencionalmente, sin el propósito de nutrir, con el objeto de modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales, durante la manufactura, procesado, preparación, tratamiento, envasado, acondicionado, almacenado (...). Este término no incluye a los contaminantes o a las sustancias nutritivas que se incorporan a un alimento para mantener o mejorar sus propiedades nutricionales”. En la declaración de éstos en la lista de ingredientes debe constar la función principal del aditivo en el alimento y su nombre completo o número de INS (Sistema Internacional de Numeración). La goma xántica, utilizada en los rellenos, al igual que el bicarbonato de sodio incorporada en las masas de galletita están incluidos en la “lista positiva” del capítulo XVIII del CAA (2014^b). (goma xántica: n° de INS 415, utilizado como Espesante/Estabilizante/Emulsificante/Espumante; bicarbonato de sodio: n° INS 500ii, utilizado como Regulador de la Acidez/Leudante Químico/Antiaglutinante Estabilizante).

Considerando esto, la lista de ingredientes de las galletitas rellenas con relleno con miel sería:

Ingredientes: Almidón de maíz, harina de trigo enriquecida (*), azúcar, leche en polvo descremada, manteca de cacao, aceite de girasol alto oleico, miel, canela, fibra de avena, estabilizante/espesante: goma xántica, leudante químico: polvo para hornear.

(*) Ley 25630 (harina, hierro 30 mg/Kg, ácido fólico 2,2 mg/Kg, vitamina B₁ 6,3 mg/Kg, vitamina B₂ 1,3 mg/Kg, niacina 13,0 mg/Kg).

- Fecha de duración

De acuerdo a los ensayos realizados, el producto ha demostrado ser estable en el envase propuesto, por un tiempo de conservación de al menos 6 meses. Este tiempo, sería adecuado para asegurar que el producto mantiene sus características de textura y su baja actividad acuosa asegura un bajo recuento de microorganismos. Según el código, para productos que tengan una duración mínima de más de tres meses, la fecha de duración deberá incluir sólo el mes y el año.

- Contenido neto de nutrientes

En el rótulo es obligatorio declarar la siguiente información de nutrientes: carbohidratos, proteínas, grasas totales, grasas saturadas, grasas *trans*, fibra alimentaria y sodio. La cantidad de energía a declarar se debe calcular utilizando los siguientes factores de conversión:

- Carbohidratos (excepto polialcoholes): 4 kcal/g - 17kJ/g
- Proteínas 4 kcal/g – 17 kJ/g
- Grasas 9 kcal/g – 37 kJ/g

Valores mayores o iguales a 100: se declararán en números enteros con tres cifras, Valores menores a 100 y mayores o iguales a 10: se declararán en números enteros con dos cifras. Valores menores a 10 y mayores o iguales a 1: se declarará con una cifra decimal. Valores menores a 1: se declarará para las vitaminas y minerales con dos cifras decimales y con una cifra decimal para el resto de los nutrientes.

La información nutricional debe ser expresada por porción (una porción es la cantidad media del alimento que debería ser consumida por personas sanas, mayores de 36 meses de edad, en cada ocasión de consumo, con la finalidad de promover una alimentación saludable). En el caso de las galletitas dulces, el producto se considera un alimento de consumo ocasional, cuya porción a consumir es de 30 g.

Para calcular el porcentaje del Valor Diario (% VD) de las calorías y de cada nutriente que aporta la porción del alimento se utilizaron los Valores Diarios de Referencia de Nutrientes (VDR) que se muestran en la Tabla 5.4.

El cálculo del contenido de sodio se realizó a partir de la información nutricional (rótulo) de los distintos ingredientes presentes en las galletitas

Tabla 5.4. Valor diario recomendado de nutrientes según el CAA

Valores diarios de referencia de nutrientes	2000 kcal – 8400 kJ
Carbohidratos	300 g
Proteínas	75 g
Grasas Totales	55 g
Grasas Saturadas	22 g
Fibra Alimentaria	25 g
Sodio	2400 mg

Los valores de nutrientes recomendados responden a los objetivos fijados por la FAO/OMS (2003) para prevenir enfermedades relacionadas a déficit dietarios; se considera que estos valores son los adecuados para una persona adulta sana. Según el CAA se debe agregar como parte de la información nutricional la siguiente expresión “Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas”.

El CAA, excluye explícitamente la declaración de grasas *trans* en porcentaje de Valor Diario (%VD). Si bien no se realizó un análisis de ácidos grasos *trans* para el producto desarrollado, ya que el mismo fue preparado con lípidos de origen vegetal no hidrogenados, se podría considerar que el mismo es libre de grasas *trans*. El rótulo del producto final se muestra en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Rótulo de las galletitas rellenas con relleno con miel de acuerdo al CAA

Información nutricional Porción 30 g (3 galletitas)		
	Cantidad por porción	% VD
Valor energético	132 Kcal = 553 KJ	6,7
Carbohidratos	22	7,2
Proteínas	2,3	3,0
Grasas Totales	4,0	7,3
Grasas saturadas	1,5	7,0
Grasas trans	-	-
Fibra alimentaria	1,0	7,0
Sodio	45,06	1,9
% Valores Diarios con base a una dieta de 2.000 kcal u 8.400 kJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas		

- Información complementaria

Según la definición del CAA, la información nutricional complementaria es *“Cualquier representación que afirme, sugiera o implique que un producto posee propiedades nutricionales particulares, especialmente, pero no sólo, en relación con su valor energético y contenido de proteínas, grasas, carbohidratos y fibra alimentaria, así como con su contenido de vitaminas y minerales”*. Como este producto contiene miel sin tratamiento térmico, el rótulo debe incluir "por su contenido de miel, no suministrar a niños menores de un año".

5.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- La presencia de canela o chocolate incrementa el poder antioxidante de masas y galletitas, a pesar de que parte de los compuestos fenólicos son termolábiles y se pierden durante el proceso de cocción.

Si bien en las masas la incorporación de chocolate incrementa más la capacidad antioxidante que la canela, luego del horneado esta tendencia se invierte. En las galletitas obtenidas, el incremento de la capacidad antioxidante fue mayor en las tapas saborizadas con canela que con chocolate.

- Las galletitas rellenas con relleno con miel presentaron una excelente aceptabilidad y una alta intención de consumo, y podrían ser incorporadas al mercado. Además, gran parte de evaluadores dieron mayores puntajes a los rellenos con miel que al control en cuanto a su sabor y aceptabilidad general, a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas entre los parámetros.
- Durante el tiempo de conservación hay una migración parcial de humedad desde los rellenos hasta las tapas; sin embargo, esto no modifica la textura global del producto durante un tiempo de conservación de 6 meses en un envase de hojalata. Sin embargo sería necesario repetir estos ensayos considerando la textura de las tapas de galletitas individualmente.
- Este envase, al ser reutilizable no es contaminante y su uso es recomendado desde el punto de vista medioambiental.
- Sin la necesidad de reemplazar las grasas y el azúcar por aditivos sintéticos, se pudo obtener una galletita rellena con un menor contenido de calorías, lípidos y un menor aporte de grasas saturadas que productos similares encontrados habitualmente en el mercado. Además, estas galletitas contenían un mayor contenido de proteínas y de fibras.

Capítulo 6

Conclusiones Generales

Se desarrollaron galletitas rellenas con un alto contenido de antioxidantes, de buena aceptabilidad y prolongada vida útil, con características similares a las encontradas habitualmente en el mercado, pero con reducido contenido de lípidos, grasas saturadas y calorías y un mayor contenido de fibras y proteínas.

Esto se logró con una formulación tipo “galletita semidulce” en las tapas, utilizando como fase lipídica aceite de girasol alto oleico, que fue elegido por su mayor estabilidad frente a la oxidación. Por otro lado, en los rellenos, la fase grasa y el azúcar se reemplazaron parcialmente por miel, un producto con una reconocida capacidad antioxidante y distintos beneficios para la salud.

El contenido de antioxidantes en galletitas depende del tratamiento térmico que se les aplique. Se puede obtener una mayor actividad antioxidante horneando a mayor temperatura por menor tiempo, que a menor temperatura durante más tiempo. El tratamiento térmico, si bien favorece la generación de antioxidantes vía reacción de Maillard, puede disminuir el contenido de antioxidantes termolábiles presentes en las masas, tanto de los ingredientes elementales de la formación (harina o leche en polvo), como de los saborizantes que puedan ser incorporados. Particularmente, se observó que, si bien la presencia de canela y chocolate incrementan el poder antioxidante de las masas, su efecto sobre el producto horneado es más moderado, ya que parte de los compuestos fenólicos son termolábiles y se pierden durante el proceso de cocción.

Los ensayos *in vitro* mostraron que algunos productos de Maillard con capacidad antioxidante pueden ser liberados en el tracto digestivo por acción enzimática. Estos compuestos estarían potencialmente biodisponibles dependiendo de su grado de absorción. Por otro lado, la fracción no liberada llega al intestino grueso, en donde puede ser metabolizada por las bacterias colónicas. Durante este último paso se libera una gran cantidad de compuestos con actividad antioxidante que ejercerían su efecto *in situ*, generando un ambiente antioxidante en el tracto intestinal.

El ensayo *in vivo* demostró que el consumo de compuestos de la reacción de Maillard derivados de un tratamiento térmico intenso disminuye la eficiencia alimentaria, provocando una disminución en el peso de los animales que hayan consumido este tipo de alimento. Además, el consumo de una dieta con altas concentraciones de compuestos de Maillard incrementa la actividad antioxidante del suero, a la vez que disminuye el nivel de oxidación lipídica, contribuye a disminuir la presión arterial, modula eficientemente la composición de la microbiota fecal, incrementando la relación de bacterias lácticas sobre bacterias totales, y aumenta la capacidad de retención de agua de la materia fecal. A partir de los resultados obtenidos se pudo inferir que el efecto antihipertensivo de los compuestos

de Maillard estaría relacionado a su poder antioxidante, y no a la capacidad quelante de zinc como se había sugerido en bibliografía a partir de ensayos realizados *in vitro*. Asimismo, se pudo demostrar también que el consumo de una dieta rica en compuestos de Maillard no disminuye la absorción mineral aparente.

La incorporación de antioxidantes en rellenos es una alternativa viable para incrementar la concentración de antioxidantes termolábiles en galletitas, ya que este proceso secundario no requiere el uso de altas temperaturas.

Las mieles argentinas presentaron distintas características dependiendo de su procedencia geográfica. Particularmente, las mieles de la región Andino Patagónica presentaron un mayor contenido de antioxidantes, mayores niveles de compuestos volátiles y menor humedad que las mieles de la provincia de Buenos Aires analizadas (Provincia Paranaense, Provincia del Espinal distrito del Talar, y provincia Pampeana, distrito Oriental). Es por esto que serían más recomendadas para su uso en rellenos de galletitas como reemplazo parcial de la manteca de cacao y el azúcar refinado.

A partir del análisis comparativo entre el perfil de compuestos volátiles, los resultados del análisis palinológico y la información encontrada en referencias bibliográficas, se podría concluir que sería necesaria una revisión de los compuestos volátiles habitualmente considerados indicadores de origen floral, como el lilac aldehído.

El empleo del diseño de mezclas y la metodología de superficie de respuesta utilizada para modelar matemáticamente los distintos parámetros de textura y contenido de antioxidantes en los rellenos resultó satisfactoria para analizar los efectos de los ingredientes de la formulación, y pudo ser correctamente validada. A partir de los modelos desarrollados fue posible optimizar una formulación de rellenos dulces en donde parte de la manteca de cacao y el azúcar refinado fueron reemplazados por miel (ingrediente que demostró presentar la máxima capacidad antioxidante). Este relleno contenía 17,7 % de miel, 33,8 % de azúcar y 24,5 % de manteca de cacao, y presentó características de textura similares a las encontradas en los productos del mercado, pero fue diseñado con ingredientes naturales, sin ningún saborizante, aromatizante, antioxidante o aditivo artificial.

Durante 6 meses de conservación a 20 °C, la capacidad antioxidante y la mayor parte de los parámetros de textura de los rellenos con miel se mantuvieron estables, no se observó oxidación lipídica, y el recuento de microorganismos demostró que el producto era apto para el consumo (la a_w final del producto resultó de 0,65).

La incorporación de canela en la formulación de galletitas es más recomendable que la incorporación de chocolate, ya que la canela incrementa más que el chocolate la capacidad antioxidante del producto horneado, a pesar de que en las masas se haya observado el efecto inverso.

Las galletitas cuyo relleno contenía miel presentaron una excelente aceptabilidad y una alta intención de consumo. Además, gran parte de los evaluadores otorgó mayores puntajes a los rellenos con miel que al control en cuanto a su sabor y aceptabilidad general, a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas entre los parámetros.

Durante el tiempo de conservación hay una migración parcial de humedad desde los rellenos hasta las tapas; sin embargo, esto no modifica la textura del producto durante un tiempo de conservación de 6 meses en un envase de hojalata. Este envase, al ser reutilizable no es contaminante, y su uso es recomendado desde el punto de vista medioambiental.

Anexos y Referencias

Tabla I.1. Identificación cualitativa de compuestos volátiles encontrados en mieles argentinas analizadas. Los compuestos (C) se ordenaron en función de su tiempo de retención (Tr). En la tabla se puede observar la relación masa/carga (m/z) de los principales fragmentos encontrados en el espectro de masa de cada compuesto. El pico base fue subrayado.

Tr (min)	C	m/z	Nombre*
5,2	C1	53,55, <u>84</u>	3-metil-2-butenal
5,3	C2	53, <u>55</u> , 57, 70	octeno
5,6	C3	55,57,71, <u>85</u>	octano
7,1	C4	67,96,	furan-2-metanal / furfural
7,2	C5	<u>57</u> ,85,128	desconocido
7,4	C6	90,91, <u>107</u> ,122	desconocido
8,0	C7	<u>57</u> ,74,85,102	isómero de metil butirato de etilo
8,2	C8	57,60,85, <u>88</u>	isómero de metil butirato de etilo
8,1	C9	79, <u>109</u> ,124	desconocido
8,4	C10	55, <u>73</u> ,	desconocido
8,3	C11	65,77, <u>91</u> ,106	etil benceno
8,7	C12	77, <u>91</u> ,103,106	dimetilbenceno / p-Xileno
9,0	C13	<u>57</u> ,71,98	3-metil octano
10,4	C14	<u>58</u> ,71,114	2-heptanona
10,6	C15	57,70, <u>81</u> ,99	dimetil tetrahidrofurano
10,8	C16	<u>57</u> , 71,85,99	nonano
10,8	C17	71,93,111, <u>125</u>	desconocido
11,0	C18	<u>70</u> ,81,86,96	heptanal
11,5	C19	<u>55</u> ,93,111,125	desconocido
13,0	C20	79, <u>93</u> ,105,121	(1S,5S)-2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]hept-2-ene / α-pineno
13,5	C21	77,79,107, <u>122</u>	hidroxi-2,3-dimetilbenceno/xilenol
14,3	C22	<u>57</u> ,69,85	3-metil propanoato de 2-metilpropilo
14,3	C23	55,67,82, <u>111</u>	desconocido
14,7	C24	57, <u>69</u> ,74,87	5-tridecanol
14,8	C25	65, <u>91</u> ,120	propil benceno
15,4	C26	51,74,77, <u>106</u>	benzaldehído
15,9	C27	77, <u>105</u> ,91,120	p-etiltolueno

Anexo I

Tr (min)	C	m/z	Nombre*
16,1	C28	57,71,85,105	alcano
17,9	C29	55, <u>57</u> ,67,72	1-octen-3-ol
18,4	C30	77,91, <u>105</u> ,120	isómero de trimetil benceno
18,5	C31	55,69, <u>108</u> ,111	6-metil-5-hepten-2-ona
18,7	C32	<u>67</u> ,81,96,110	2,6-dimetil- 1,6-octadieno
19,6	C33	43, <u>57</u> ,71,85	decano
20,0	C34	<u>57</u> ,69,82,84	octanal
20,2	C35	<u>67</u> ,96,110,137	2,6- dimetil-1,6-octadieno
21,6	C36	91, <u>119</u> ,134	p-metilisopropilbenceno/ cimeno
20,4	C37	91, <u>105</u> ,120	5-(1-metil)-propilen-1,3 ciclopentadieno
20,6	C38	55,57,67, <u>71</u>	desconocido
20,8	C39	93, <u>121</u> ,136	isómero de 4-metil-1-(1-metiletil)-1,3-ciclohexadieno/ isómero de terpineno
21,2	C40	77,91, <u>105</u> ,120	Isómero de trimetil benceno
21,3	C41	77,91,107, <u>122</u>	4-metoxi-2-metilbenceno / p-metilanisol
21,6	C42	91, <u>119</u> ,134	isómero de metil isopropilbenceno/ metil cumeno
21,9	C43	<u>68</u> ,79,9,107	4-isopropenil-1-metilciclohexeno/ limoneno
22,8	C44	<u>57</u> ,70,83,98	2-etil-1- hexanol
23,3	C45	67,81,91, <u>96</u>	trimetil-ciclohexen-1-ona/isoforona
23,4	C46	65, <u>91</u> ,120	fenil-acetaldehído
24,1	C47	77,79,91, <u>93</u>	(Z)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno/ β-ocimeno
24,3	C48	69,91,93, <u>111</u>	desconocido
24,6	C49	77,91, <u>93</u> ,119	isómero de terpineno
25,0	C50	55, <u>91</u> ,93,120	1- cloro octano
25,2	C51	77, <u>105</u> ,120	1-feniletanona / acetofenona
25,6	C52	<u>79</u> ,93,109,137	desconocido
25,8	C53	55, <u>59</u> ,69,94	óxido de 2,6-dimetil-2,7-octadien-6-ol / isómeros de óxido de linalool
26,8	C54	77,79,93, <u>121</u>	isómero de terpineno

Anexo I

Tr (min)	C	m/z	Nombre*
27,0	C55	91,115,117, <u>132</u>	metil isopropilbenceno
27,0	C56	<u>59</u> ,68,94,111	isomero de linalool
27,5	C57	55,58, <u>67</u> ,94	desconocido
27,5	C58	55, <u>58</u> ,67,71	2-nonanona
27,7	C59	107,135, <u>150</u>	desconocido
28,0	C60	55, <u>71</u> ,80,93	isomero de linalool
28,1	C61	60, <u>83</u> ,101,113	heptanoato de etilo
28,3	C62	55, <u>57</u> ,80,82	nonanal
28,6	C63	69,83,109, <u>139</u>	metil-2-(2-metilenlpropenil)- tetrahydro-2H-pirano/ óxido de rosa
28,8	C64	<u>93</u> ,108,119	desconocido
29,1	C65	54, <u>82</u> ,138	trimetil cilcohexen-1-ona/ isoforona
29,6	C66	55,69,85, <u>139</u> ,	desconocido
30,1	C67	91, <u>119</u> ,134	metil-4-(propenil)clicohexa-1,3 dieno/ isómero de p-mentatriene
30,6	C68	<u>55</u> ,67,71,93	isómero de lilacaldehido
30,9	C69	67, <u>109</u> ,137,152	1-(1,4- dimetil-3-ciclohexen)- etanona
30,9	C70	77,109,115, <u>129</u>	desconocido
31,1	C71	<u>55</u> ,67,71,93	isómero de lilacaldehido
31,0	C72	65,91,119, <u>134</u>	p-vinil metoxibenceno/ p-vinil anisol
31,4	C73	<u>68</u> ,83,109,152	4-Metil -2(2-metil-1-propenil)-3,6-dinhydro-2H-pirano /óxido de Nerol
31,5	C74	53, <u>81</u> ,108,135	3,3-dimetil-2-biciclo[2.2.1] heptanona/ trimetil norbonanona
31,5	C75	79,91, <u>107</u> ,135	isómeros de 2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexencarbaldehido / isómeros de Safranal
31,8	C76	79,91, <u>107</u> ,135	isómero del Safranal
31,5	C77	53, <u>81</u> ,108,135	6,6-dimetil-2-metilenbiciclo[3.1.1]heptan-3-ona /Pinocarbona
31,7	C78	67,93, <u>96</u> ,110	(1S-endo)-1,7,7-trimetilbiciclo[2.2.1]heptan-2-ol / Borneol
32,0	C79	<u>55</u> ,71,93,111	isómero de lilacaldehido

Anexo I

Tr (min)	C	m/z	Nombre*
32,1	C80	79,107,135, <u>150</u>	desconocido
32,2	C81	91, <u>105</u> ,119,134	metil 2-hidroxibenzoato/ salicilato de metilo
32,4	C82	77,105,122, <u>128</u>	biciclo [4.4.0]deca-1,3,5,7,9-penteno / naftaleno
32,5	C83	<u>71</u> ,93,111,136	4-metil-1-(1-metiletil)-3-cliclohexen-1-ol
33,0	C84	79,91,109, <u>137</u>	3,6-dimetil- 2,3,3a,4,5,7a-hexahidrobenzofurano
33,1	C85	79,122, <u>135</u> ,150	desconocido
33,5	C86	79,92, <u>120</u> ,152	salicilato de metilo
33,5	C87	<u>79</u> ,91,107,121	6,6-dimetil-2-carbaxaldehido-biciclo [2.2.1]heptano
33,8	C88	91,105, <u>107</u> ,121	isómeros. de safranal
34,0	C89	57,70,73, <u>86</u> ,101	octanoato de etilo
34,1	C90	<u>57</u> ,71,85,170	dodecano
34,1	C91	67,79,91,94, <u>122</u>	desconocido
34,2	C92	128,144, <u>159</u>	1,1,6-trimetil-1,2,3,4 tetrahidro-naftaleno/ β -ionona
34,3	C93	<u>57</u> ,68,7,82,95	decanal
34,4	C94	57,70,117, <u>145</u>	4,7- dimetil benzofurano
33,2	C95	67,79, <u>94</u>	2-(4-metilciclohexen-3-en-1-yl)propanal/ 1-p-menthen-9-al
34,9	C96	89,115, <u>144</u>	3-fenil furano
35,3	C97	93,108, <u>121</u> ,136	1,7,7 trimetil-biciclo hepten-2-eno /2-borneno/bornileno
36,4	C98	65, <u>91</u> ,164	benzoato de etilo
37,8	C99	121,136, <u>192</u>	desconocido
39,0	C100	73,77, <u>88</u> ,101	nonanoato de etilo
37,6	C101	<u>57</u> ,71,85	tridecano
39,5	C102	55, <u>57</u> ,68,71,82	undecanal
41,3	C103	115,142, <u>157</u>	1,1,5 trimetil-1,2 dihidro naftaleno
42,4	C104	119,147, <u>189</u>	desconocido
42,7	C105	<u>69</u> ,105,121	1-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexa-1,3-dienil)but-2-en-1-ona/ β -damascenona
43,2	C106	70,73, <u>88</u> ,101	decanoato de etilo

Anexo I

Tr (min)	C	m/z	Nombre*
44,3	C107	53, <u>80</u> ,171	desconocido
44,8	C108	57, <u>71</u> ,85	hidrocarburo
45,0	C109	93, <u>107</u> ,119	1,4-dimethyl -1,2,3,5,6,7,8,8a octahidro- -7-(1-metiletil)azuleno
45,7	C110	<u>57</u> ,7,85,99	pentadecano

* Para asegurar la correcta caracterización de los compuestos aislados, se consideró que el espectro de masa encontrado debía coincidir con los publicados en la National Institute of Standards and Technology en al menos un 75 %. En el caso de no encontrarse coincidencia al nivel fijado, el compuesto fue considerado "Desconocido".

Los compuestos correctamente caracterizados fueron nombrados de modo sistemático de acuerdo a las reglas Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). En el caso de compuestos con nombres triviales (comunes), estos se incluyeron a continuación de la nomenclatura sistemática separándolos mediante una barra diagonal.

Anexo II

Tabla II.1. Análisis cuantitativo de compuestos volátiles presentes en las muestras de miel. Los resultados se expresaron en función del área relativa al patrón interno (estireno).

C	Patagonia Andina	BsAs Talar	BsAs Oriental	BsAs Paranaense
C1	0,068	0,047	0,015	0,033
C2	0,137^b	0,039^a	0,045^a	0,014^a
C3	1,434^b	0,747^a	0,558^a	0,739^a
C4	0,396	0,209	0,173	0,255
C5	0,330	0,120	0,053	0,200
C6	0,137	0,046	0,017	0,009
C7	0,001	0,013	0,005	0,007
C8	ND	0,041	0,016	0,009
C9	ND	0,041	0,016	0,009
C10	ND	ND	ND	0,026
C11	0,009	0,006	0,043	0,017
C12	0,055	0,040	0,198	0,081
C13	ND	ND	0,001	0,018
C14	0,051	0,019	0,014	0,019
C15	0,007^a	0,071^b	0,057^{ab}	0,015^a
C16	0,254	0,180	0,144	0,150
C17	0,092	0,044	0,017	0,006
C18	0,249^b	0,080^a	0,034^a	0,021^a
C19	0,019	0,006	0,003	0,001
C20	0,013	0,018	0,023	0,018
C21	0,018^b	0,005^a	0,002^a	0,001^a
C22	ND	ND	ND	0,044
C23	0,049^b	0,013^a	0,005^a	0,002^a
C24	ND	ND	ND	0,041
C25	0,014	0,005	0,010	0,006
C26	0,813^b	0,488^a	0,227^a	0,494^b
C27	ND	ND	0,057	0,027
C28	ND	ND	0,002	0,010
C29	ND	0,022	0,010	0,004
C30	0,113	0,097	0,149	0,109

Anexo II

C	Patagonia Andina	BsAs Talar	BsAs Oriental	BsAs Paranaense
C31	0,019	0,010	0,002	0,010
C32	0,059^a	0,040^a	0,059^a	0,201^b
C33	0,043^b	0,016^a	0,012^a	0,007^a
C34	0,209	0,165	0,080	0,074
C35	0,022	0,039	0,074	0,232
C36	ND	ND	ND	0,027
C37	ND	0,002	0,018	0,008
C38	0,003	0,001	ND	ND
C39	0,032	0,018	0,021	0,045
C40	0,026	0,017	0,019	0,012
C41	0,027^b	0,006^a	0,002^a	0,001^a
C42	0,101	0,082	0,083	0,064
C43	0,066	0,061	0,036	0,044
C44	0,033^b	0,016^{ab}	0,004^a	0,001^a
C45	0,006	0,003	0,001	ND
C46	0,116	0,165	0,144	0,189
C47	0,022^b	0,007^a	0,004^a	0,012^a
C48	0,020^b	0,005^a	0,002^a	0,001^a
C49	0,149^b	0,066^a	0,033^a	0,032^a
C50	0,016	0,007	0,004	0,009
C51	0,038^b	0,011^a	0,004^a	0,003^a
C52	0,004	0,003	0,005	0,002
C53	0,222	0,205	0,067	0,142
C54	0,036^b	0,015^a	0,006^a	0,004^a
C55	0,135	0,334	0,649	0,357
C56	0,018	0,009	0,003	0,001
C57	0,038	0,016	0,013	0,018
C58	0,046	0,025	0,017	0,014
C59	0,009	0,003	0,001	0,021
C60	0,672^b	0,235^a	0,068^a	0,034^a
C61	ND	0,007	0,004	0,001
C62	1,609^b	0,895^a	0,497^a	0,414^a
C63	0,007	0,025	0,014	0,037

Anexo II

C	Patagonia Andina	BsAs Talar	BsAs Oriental	BsAs Paranaense
C64	0,009	0,003	0,001	ND
C65	0,151^b	0,056^a	0,016^a	0,006^a
C66	0,009	0,006	0,002	0,001
C67	0,016	0,044	0,081	0,087
C68	0,327^b	0,100^a	0,067^a	0,076^a
C69	0,027	0,010	0,004	0,001
C70	0,017	0,031	0,047	0,043
C71	0,502^b	0,149^a	0,104^a	0,101^a
C72	0,009	0,044	0,015	0,006
C73	0,037	0,045	0,049	0,027
C74	0,074	0,049	0,019	0,007
C75	0,082	0,030	0,011	0,006
C76	0,013	0,006	0,003	0,001
C77	0,014	0,005	0,002	0,004
C78	0,084^b	0,026^a	0,009^a	0,003^a
C79	0,182^b	0,052^a	0,028^a	0,029^a
C80	ND	0,019	0,014	0,013
C81	0,021	0,113	0,048	0,019
C82	0,001^a	0,008^b	0,002^a	0,001^a
C83	0,025^b	0,007^a	0,002^a	0,001^a
C84	0,006	0,010	0,011	0,040
C85	ND	0,003	0,006	0,002
C86	0,030^b	0,013^a	0,004^a	0,001^a
C87	0,072	0,032	0,011	0,013
C88	0,027	0,010	0,004	0,002
C89	ND	0,031	0,014	0,006
C90	0,030^b	0,010^a	0,006^a	0,002^a
C91	ND	0,002	0,001	0,015
C92	0,002	0,006	0,005	0,010
C93	1,301	0,605	0,241	0,176
C94	ND	ND	0,013	0,031
C95	0,123	0,081	0,073	0,206
C96	0,025	0,012	0,004	0,002

Anexo II

C	Patagonia Andina	BsAs Talar	BsAs Oriental	BsAs Paranaense
C97	0,033	0,011	0,004	0,003
C98	ND	0,059	0,025	0,009
C99	ND	0,001	0,001	0,006
C100	ND	0,017	0,008	0,003
C101	0,050	0,037	0,015	0,009
C102	0,021^b	0,005^a	0,002^a	0,001^a
C103	0,005	0,018	0,011	0,017
C104	ND	ND	ND	0,006
C105	0,162	0,072	0,020	0,009
C106	ND	0,005	0,002	0,001
C107	0,010	0,005	0,002	0,001
C108	0,017	0,013	0,003	0,001
C109	0,022	0,008	0,003	0,003
C110	0,042	0,022	0,006	0,002

Los valores informados corresponden a las medias de n=8 para la región Patagonia Andina y n=6 para la región Bs.As. Talar, Bs.As. Oriental y Bs.As Paranaense.

Superíndices iguales o valores sin superíndices indican que las medias no se diferencian significativamente ($P > 0,05$).

ND = No detectado

Tabla III.1. Adhesividad y cohesividad en los rellenos analizados. La composición de las formulaciones se expresan en función de los valores porcentuales de miel, azúcar impalpable y manteca de cacao

Formulación	Miel	Azúcar impalpable	Manteca de Cacao	Adhesividad (J)	Cohesividad
1	20	46	10	$0,05 \pm 0,04^a$	$0,19 \pm 0,04^c$
2	23	23	30	$0,85 \pm 0,38^e$	$0,36 \pm 0,09^e$
3	10	46	20	$0,12 \pm 0,09^{a,b}$	$0,15 \pm 0,03^b$
4	46	0	30	$0,99 \pm 0,41^e$	$0,33 \pm 0,06^e$
5	0	46	30	$0,09 \pm 0,02^{a,b}$	$0,10 \pm 0,01^a$
6	46	20	10	$0,32 \pm 0,15^{b,c}$	$0,35 \pm 0,02^e$
7	33	33	10	$0,28 \pm 0,14^{a,b,c}$	$0,23 \pm 0,05^c$
8	37	14	25	$0,94 \pm 0,46^e$	$0,47 \pm 0,04^f$
9	19	37	20	$0,43 \pm 0,26^{c,d}$	$0,17 \pm 0,03^b$
10/13	28	28	20	$0,97 \pm 0,55^e$	$0,29 \pm 0,07^d$
11	46	10	20	$0,71 \pm 0,09^{d,e}$	$0,38 \pm 0,02^e$
12	37	24	15	$0,89 \pm 0,30^e$	$0,33 \pm 0,03^e$

Los valores informados corresponden a las medias \pm las desviaciones estándar. Superíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente ($P > 0,05$).

Tabla III.2. Firmeza, elasticidad y tiempo de relajación determinado en los rellenos.

Formulación	Firmeza (N)	Elasticidad	Tiempo de relajación (s)
1	71,94 ± 33,2 ^f	0,16 ± 0,03 ^d	0,24 ± 0,06 ^d
2	4,56 ± 0,87 ^{a,b}	0,01 ± 0,001 ^a	0,06 ± 0,02 ^a
3	54,14 ± 8,57 ^e	0,31 ± 0,03 ^f	0,17 ± 0,02 ^c
4	12,44 ± 7,75 ^b	0,07 ± 0,004 ^b	0,15 ± 0,02 ^c
5	13,31 ± 5,26 ^b	0,47 ± 0,07 ^g	0,10 ± 0,05 ^b
6	0,83 ± 0,07 ^a	0,02 ± 0,004 ^a	0,07 ± 0,01 ^{a,b}
7	5,95 ± 3,47 ^{a,b}	0,03 ± 0,004 ^a	0,06 ± 0,02 ^a
8	3,91 ± 0,77 ^{a,b}	0,05 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,02 ^{a,b}
9	39,97 ± 8,39 ^d	0,23 ± 0,02 ^e	0,17 ± 0,03 ^c
10/13	25,03 ± 8,68 ^c	0,14 ± 0,04 ^c	0,15 ± 0,04 ^c
11	2,02 ± 0,38 ^a	0,01 ± 0,008 ^a	0,08 ± 0,02 ^{a,b}
12	4,96 ± 2,94 ^{a,b}	0,02 ± 0,005 ^a	0,07 ± 0,02 ^a

Los valores informados corresponden a las medias ± las desviaciones estándar. Superíndices iguales en la misma columna indican que las medias no se diferencian significativamente (P > 0,05).

A

- AACC (1983). Method 08-01 Ash - Basic Method. En Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 8° ed. Amer. Assn. of Cereal Chemists, St. Paul Minnesota, Estados Unidos
- AACC (1983). Method 30-25.01 Crude Fat in Wheat, Corn, and Soy Flour, Feeds, and Mixed Feeds. En Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 8° ed. Amer. Assn. of Cereal Chemists, St. Paul Minnesota, Estados Unidos
- AACC (1983). Method 46-12.01 Crude Protein - Kjeldahl Method, Boric Acid Modification. En Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 8° ed. Amer. Assn. of Cereal Chemists, St. Paul Minnesota, Estados Unidos
- AACC (1983). Standard Method 30–10. Crude fat in flour, bread, and baked cereal products not containing fruit. En Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 8° ed. Amer. Assn. of Cereal Chemists, St. Paul Minnesota, Estados Unidos
- AACC (2000). Method 32-05. Total Dietary Fiber.. En American Association of Cereal Chemists, 10° ed. Amer. Assn. of Cereal Chemists, St. Paul Minnesota, Estados Unidos
- Abejón, E. G. (2010). La aterosclerosis como desencadenante de la patología cardiovascular. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, 7, 1-28.
- Acquarone, C., Buera, P. y Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. Food Chemistry, 101(2), 695-703.
- Action, E. C. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. British Journal of Nutrition, 81(1),S1-S27
- Acuña, A. M. y Petrantonio, M. (2003). La innovación tecnológica como estrategia de desarrollo empresarial: El caso de la industria de galletitas en Argentina. Agroalimentaria, (16), 13-28.
- Adel, Z. M. B., Siham, M. M. F., Ahmed, T. M. E. y Barakat, S. M. M. (2002). Application of some spices in flavouring and preservation of cookies: 2. Antimicrobial and sensory properties of cardamom, cinnamon and clove. Deutsche-Lebensmittel-Rundschau, 98, 261-265.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A. y Fowler, M. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate– A review. Trends in Food Science & Technology, 18(6), 290-298.
- Afoakwa, E. O. (2016). Chocolate science and technology. John Wiley & Sons. York, Reino Unido.

- Agurto Mendez, L. y Peralta Madariaga, A. K. (2010). Determinación de hidroximetilfurfural (HMF) en la miel como indicador de envejecimiento y calidad en el procesamiento y la conservación. Tesis doctoral, Universidad de Talca, Talca, Chile.
- Ajila, C. M., Leelavathi, K. y Rao, U. P. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 319-326.
- Aloisi, P. V. (2010). Determination of Quality Chemical Parameters of Honey from Chubut (Argentinean Patagonia). *Agricultura Técnica*, 70(4), 640-645.
- Alvarez-Suarez, M.J., Giampieri, F. y Battino, M. (2013). Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 621-638.
- Alves, A., Ramos, A., Gonçalves, M. M., Bernardo, M. y Mendes, B. (2013). Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), 130-138.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., ... y Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188-205.
- Anderson, M. R y Calderón, V. (1999). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España.
- ANMAT (2016). Los alimentos y las enfermedades. Disponible en <http://www.anmat.gob.ar/Alimentos/Los%20alimentos%20y%20las%20enfermedades.pdf>. [Acceso 04/01/2017]
- ANMAT (2011). Disponible en <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/190000-194999/190064/norma.htm>. [Acceso 04/01/2017].
- ANMAT (2014). Metodología analítica oficial, análisis microbiológico de alimentos. Microorganismo indicadores. Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (Reneloa). Disponible en http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf. [Acceso 31/05/2016].
- Anton, P. M., Craus, A., Niquet-Léridon, C. y Tessier, F. J. (2012). Highly heated food rich in Maillard reaction products limit an experimental colitis in mice. *Food & Function*, 3(9), 941-949.
- Anwar, F., Bhanger, M. I. y Kazi, T. G. (2003). Relationship between rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(2), 151-155.

- AOCS (1998). Cd 12b-92 Oil Stability Index. En Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, 5^oed. American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois, Estados Unidos.
- Aparicio, J. P., Rosales, V. L. y Medina, M. A. T. (2008). Diseño de productos envasados frescos. Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros, (208), 64-66.
- Arain, S., Sherazi, S. T. H., Bhanger, M. I., Talpur, F. N. y Mahesar, S. A. (2009). Oxidative stability assessment of Bauhinia purpurea seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat methods. Thermochimica Acta, 484(1), 1-3.
- Araya H. y Alviña M. (2009). Capítulo VII: Productos de panificación funcionales. En Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación. Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. Pp 146-168
- Ashwell M. (2002). Conceptos sobre Alimentos Funcionales. En ILSI Europe Concise Monograph Series. ILSI Press, Bruselas, Bélgica

B

- Baixauli, R., Salvador, A., Hough, G. y Fiszman, S. M. (2008). How information about fibre (traditional and resistant starch) influences consumer acceptance of muffins. Food Quality and Preference, 19(7), 628-635.
- Bajaj, S., Urooj, A. y Prabhasankar, P. (2006). Effect of incorporation of mint on texture, colour and sensory parameters of biscuits. International Journal of Food Properties, 9(4), 691-700.
- Baldi Coronel, B (2010). La miel. Una mirada científica, 1^o ed. Universidad Nacional de Entre Ríos, Concepción del Uruguay, Argentina.
- Baldi Coronel, B. (1998). Estudio bromatológico de mieles argentinas en relación a su origen botánico. Tesis doctoral, Universidad. Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Baltsavias, A., Jurgens, A. y Van Vliet, T. (1997). Rheological properties of short doughs at small deformation. Journal of Cereal Science, 26(3), 289-300.
- Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A. y Robledo C.W. (2008). Infostat. Manual del Usuario. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Bär N. (2010). La dieta de los argentinos es de baja calidad. Disponible en <http://www.lanacion.com.ar/1300821-la-dieta-de-los-argentinos-es-de-baja-calidad> [Acceso 20/05/16].

- Bär N. (2016). Dieta argentina: menos carne roja y más azúcares Disponible en <http://www.lanacion.com.ar/1941662-dieta-argentina-menos-carne-roja-y-mas-azucares-pero-las-mismas-calorias> [Acceso 20/05/16].
- Baroni, M. V., Arrua, C., Nores, M. L., Fayé, P., del Pilar Díaz, M., Chiabrando, G. A. y Wunderlin, D. A. (2009). Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*, 114(2), 727-733.
- Baroni, M. V., Nores, M. L., Díaz, M. D. P., Chiabrando, G. A., Fassano, J. P., Costa, C. y Wunderlin, D. A. (2006). Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7235-7241.
- Barroso, L. S., de Oliveira, V. R., Garcia, A. V., Doneda, D., Ouriques, L. A. X. y Vieira, M. (2015). Chemical and sensory evaluation of sandwich cookies made with carob powder. *Trabajos completos del 5° Simpósio de segurança Alimentar*, 1-4.
- Battaiotto, L.L, Dello Staffolo, M., Lupano, C.E. y Bevilacqua, A.E. (2012). Gomas alimentarias: efecto sobre la calidad final de rellenos de galletitas a base de queso de oveja. *Trabajos completos del IV Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba Argentina 2012*
- Battaiotto, L. L., Lupano, C. E. y Bevilacqua, A. E. (2013). Optimization of basic ingredient combination for sandwich cookie filling using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 6(7), 1847-1855.
- Battaiotto L.L; Patrignani M.; Conforti; P.A. y Lupano, C.E. (2015). Actividad acuosa y parámetros de textura de rellenos de galletitas: uso de miel en reemplazo de sacarosa. En *Trabajos completos del XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Buenos Aires; Argentina.
- Bekedam, E. K., Schols, H. A., Van Boekel, M. A. y Smit, G. (2006). High molecular weight melanoidins from coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7658-7666.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Dujmović, M., Karlović, S., Biškić, M., Brnčić, M. y Ježek, D. (2015). Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives. *Food Chemistry*, 167, 61-70.
- BeMiller J. N. y Whistler R.L. (2010). Capítulo 4: Hidratos de Carbono. En *Química de los Alimentos*, 3ª ed. Acribia, Zaragoza, España. Pp 189-265
- Benzie, I. F. y Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M. y Maffei Facino, R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533: 185-191.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M. y Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822-828.
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W. y Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269-275.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. y Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., ... y Flamini, C. (1999). Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee world*, 80(2), 61-69.
- Bogdanov, S., Martin, P. y Lullmann, C. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. Swiss Bee Research Centre, Liebefeld., Suiza.
- Bonanome, A. y Grundy, S. M. (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New England Journal of Medicine*, 318(19), 1244-1248.
- Boobier, W. J., Baker, J. S. y Davies, B. (2006). Development of a healthy biscuit: an alternative approach to biscuit manufacture. *Nutrition Journal*, 5(1), 1.
- Boobier, W. J., Steven Baker, J., Hullen, D., Graham, M. R. y Davies, B. (2007). Functional biscuits and coronary heart disease risk factors. *British Food Journal*, 109(3), 260-267.
- Borneo, R., Kocer, D., Ghai, G., Tepper, B. J. y Karwe, M. V. (2007). Stability and Consumer Acceptance of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids (Eicosapentaenoic Acid, 20: 5, n-3 and Docosahexaenoic Acid, 22: 6, n-3) in Cream-Filled Sandwich Cookies. *Journal of Food Science*, 72(1), S049-S054.
- Borrelli, R. C. y Fogliano, V. (2005). Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 673-678.
- Borrelli, R. C., Mennella, C., Barba, F., Russo, M., Russo, G. L., Krome, K., ... y Fogliano, V. (2003). Characterization of coloured compounds obtained by enzymatic extraction of bakery products. *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1367-1374.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J. y Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1931-1937.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32 (7) 62-66,72.

- Bouseña, A., Collin, S. y Dufour, J. P. (1992). Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic headspace GC-MS system. *Journal of Apicultural Research*, 31(2), 96-109.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Broda R. (2014). La Argentina es uno de los países con mayor consumo de galletitas del mundo. Disponible en <http://www.diariochaco.com/noticia/la-argentina-es-uno-de-los-paises-con-mayor-consumo-de-galletitas-del-mundo> [Acceso 30/01/2017]
- Brudzynski, K. y Kim, L. (2011). Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity. *Food Chemistry*, 126(3), 1155-1163.
- Budryn, G., Nebesny, E., Podsedek, A., Żyżelewicz, D., Materska, M., Jankowski, S. y Janda, B. (2009). Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *European Food Research and Technology*, 228(6), 913-922.

C

- CAA (2010). Código Alimentario Argentino, Capítulo X: Alimentos Azucarados. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_X.pdf [Acceso 09/01/17]
- CAA (2013)^a. Código Alimentario Argentino, Capítulo V: Normas Para La Rotulación y Publicidad de los Alimentos. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf [Acceso 31/05/2016]
- CAA (2013)^b. Código Alimentario Argentino. Capítulo IV: Utensilios, Recipientes, Envases, Aparatos y Accesorios. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_IV.pdf [Acceso 06/05/2017]
- CAA (2014)^a. Código Alimentario Argentino, Capítulo IX: Alimentos Farináceos Cereales, Harinas y Derivados. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_IX.pdf [Acceso 31/05/2016]
- CAA (2014)^b. Código Alimentario Argentino, Capítulo XVIII: Aditivos Alimentarios Disponible en http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVIII.pdf [Acceso 31/05/2016]
- Cabrera, A.L. (1968). Flora de la Provincia de Buenos Aires. Parte I. Colección Científica del INTA, Buenos Aires, Argentina. pp 102-119
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S. y Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic

- fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77, 156-161.
- Caponio, F., Giarnetti, M., Paradiso, V. M., Summo, C. y Gomes, T. (2013). Potential use of extra virgin olive oil in bakery products rich in fats: a comparative study with refined oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(1), 82-88.
- Caponio, F., Summo, C., Paradiso, V. M., Pasqualone, A. y Gomes, T. (2009). Evolution of the oxidative and hydrolytic degradation of biscuits' fatty fraction during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8), 1392-1396.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., De La Fuente, E. y Pérez-Coello, M. S. (2008). Influence of storage conditions on chemical composition and sensory properties of citrus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1999-2006.
- Cervera, S. S. y Cervera, M. M. S. (1994). Humedad, cenizas y conductividad eléctrica de mieles de La Rioja. *Zubía*, (12), 143-158.
- Chan, K. W., Iqbal, S., Khong, N. M. y Babji, A. S. (2011). Preparation of deodorized antioxidant rich extracts from 15 selected spices through optimized aqueous extraction. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(25), 6067-6075.
- Chang, X., Wang, J., Yang, S., Chen, S. y Song, Y. (2011). Antioxidative, antibrowning and antibacterial activities of sixteen floral honeys. *Food & Function*, 2(9), 541-546.
- Cheftel, J-C. y Cheftel, H. (1976). Introducción a la Bioquímica y Tecnología De Los Alimentos, volumen I, 1° ed. Acribia,. Zaragoza, España.
- Cheftel, J-C. y Cheftel, H. (1983). Capítulo II-3: Granos vegetales. En Introducción a la Bioquímica y Tecnología De Los Alimentos, volumen I, 2° ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp 99-129.
- Chepulis, L. M. (2008). An investigation of the health benefits of honey as a replacement for sugar in the diet. Tesis doctoral, Universidad de Waikato, Nueva Zelanda
- Chepulis, L. y Starkey, N. (2008). The long-term effects of feeding honey compared with sucrose and a sugar-free diet on weight gain, lipid profiles, and dexta measurements in rats. *Journal of Food Science*, 73(1), H1-H7.
- Chirife, J. (1978). Prediction of water activity in intermediate moisture foods. *International Journal of Food Science & Technology*, 13(5), 417-424.
- Chirife, J., Zamora, M. C. y Motto, A. (2006). The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 287-292.

- Chua, L. S., Rahaman, N. L. A., Adnan, N. A. y Eddie Tan, T. T. (2013). Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components. *Journal of analytical methods in chemistry*, 1-8..
- Ciappini, M. C., Stoppani, F. S., Martinet, R. y Alvarez, M. B. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (19), 45-51.
- Clavijo Díaz, A. (2002). Fundamentos de química analítica: equilibrio iónico y análisis químico, 1° ed. Univ. Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Conforti P. (2009). Obtención y caracterización de productos de panadería con componentes regionales y de alto valor nutricional .Tesis doctoral, Universidad. Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Conforti, P. A. y Lupano, C. E. (2004). Functional properties of biscuits with whey protein concentrate and honey. *International journal of food science & technology*, 39(7), 745-753.
- Conforti, P. A., Lupano, C. E., Malacalza, N. H., Arias, V. y Castells, C. B. (2006). Crystallization of honey at- 20 C. *International Journal of Food Properties*, 9(1), 99-107.
- Crofton, E. C., Markey, A. y Scannell, A. G. (2013). Consumers' expectations and needs towards healthy cereal based snacks: An exploratory study among Irish adults. *British Food Journal*, 115(8), 1130-1148.

D

- DESA (2010). Departamento de Evaluación Sensorial de Alimentos (DESA), Curso taller de evaluación sensorial de alimentos. Instituto Superior De Tecnología Alimenticia.
- da Silva, J. K., Cazarin, C. B. B., Colomeu, T. C., Batista, Â. G., Meletti, L. M., Paschoal, J. A. R., ... y Júnior, M. R. M. (2013). Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: in vitro and in vivo study. *Food Research International*, 53(2), 882-890.
- da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. y Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.
- de Castro, M. L. y Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.
- de Dienes, A. H. y Navarro, T. G. (2008). Alternativas de empaque para galletas de mantequilla: evaluación comparativa del ciclo de vida. *Anales de la Universidad Metropolitana*, 8(1), 163-185

- Dean, M., Shepherd, R., Arvola, A., Vassallo, M., Winkelmann, M., Claupein, E., ... y Saba, A. (2007). Consumer perceptions of healthy cereal products and production methods. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 188-196.
- Decagon Devices, Inc (2011). AquaLab Water Activity Meter Operator's Manual Trademarks. Pullman, Estados Unidos.
- Del Pino-García, R., González-SanJosé, M. L., Rivero-Pérez, M. D., García-Lomillo, J. y Muñiz, P. (2016). Total antioxidant capacity of new natural powdered seasonings after gastrointestinal and colonic digestion. *Food Chemistry*, 211, 707-714.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., y Navarro, M. P. (2004). Bioavailability of iron from a heat treated glucose-lysine model food system: assays in rats and in Caco-2 cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1507-1513.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I y Navarro, M. P. (2005)^a. Comparative effects of glucose-lysine versus glucose-methionine Maillard reaction products consumption: in vitro and in vivo calcium availability. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(7), 679-684.
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A. y Morales, F. J. (2005)^b. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7832-7836.
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A. y Morales, F. J. (2006). Study on fluorescence of Maillard reaction compounds in breakfast cereals. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(9), 799-804.
- Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J. A. y Morales, F. J. (2009). Hydroxymethylfurfural in commercial biscuits marketed in Spain. *Journal of Food & Nutrition Research*, 48(1).
- Delgado-Andrade, C., Morales, F. J., Seiquer, I. y Navarro, M. P. (2010)^a. Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes. *Food research international*, 43(5), 1304-1311.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Haro, A., Castellano, R. y Navarro, M. P. (2010)^b. Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chemistry*, 122(1), 145-153.
- Delgado-Andrade, C., Conde-Aguilera, J. A., Haro, A., de la Cueva, S. P. y Rufián-Henares, J. Á. (2010)^c. A combined procedure to evaluate the global antioxidant response of bread. *Journal of Cereal Science*, 52(2), 239-246.
- Delgado-Andrade, C., Roncero-Ramos, I., Carballo, J., Rufián-Henares, J. Á., Seiquer, I. y Navarro, M. P. (2013)^a. Composition and functionality of bone affected by dietary glycated compounds. *Food & Function*, 4(4), 549-556.

- Delgado-Andrade, C., Roncero-Ramos, I., Haro, A., Morales, F. J., Seiquer, I. y Navarro, M. P. (2013)^b. Effects of diets supplemented with MRPs from bread crust on the food intake and body weights in rats. *Food & Function*, 4, 1016-1022.
- Delgado-Andrade, C., Roncero-Ramos, I., Haro, A., Pastoriza, S. y Navarro, M. P. (2015). Do bread-crust-derived Maillard reaction products affect the retention and tissue distribution of trace elements?. *European Journal of Nutrition*, 1-9.
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., Clementz, A. y Pranzetti, V. (2010). El color en los alimentos: determinación de color en mieles. *Invenio: Revista de investigación académica*, (25), 145-152.
- Delplanque, B., Tavella, M. y Peterson, G. (2001). El aceite de girasol de alto oleico y la prevención de la aterosclerosis. Estudio documental de revisión y recopilación bibliográfica de los beneficios de la utilización del aceite de girasol alto oleico. Natreon® Convenio DowAgroSciences Argentina y UNLP (PROPIA). Disponible en: <https://www.biol.unlp.edu.ar/bromatologia/prevencionaterosclerosis.pdf> [Acceso 09/01/17]
- Design-Expert® software (2005). Manual de usuario de Design-Expert software. Stat-Ease, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos.
- Devlin, T.M. (2004). Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas, 4^a ed. Reverté S.A., Barcelona, España. P. 151.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W (2014). InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Doporto, M. C. (2014). Aprovechamiento integral de raíces de ahípa (*Pachyrhizus ahípa*) y sus productos derivados con fines alimentarios. Tesis doctoral, Universidad. Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Drewnowski, A., Nordensten, K. y Dwyer, J. (1998). Replacing sugar and fat in cookies: impact on product quality and preference. *Food Quality and Preference*, 9(1), 13-20.
- Duhagon, P., Falero, P., Farré, Y., Gambetta, J. C., Gutiérrez, G., Köncke, F. y Pardo, L. (2005). Promoción de la salud cardiovascular en la infancia. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 76(1), 51-58.

E

- Eastwood, M. A. (1992). The physiological effect of dietary fiber: An update. *Annual Review of Nutrition*, 12, 19-35.

- Echavarría, A. P., Pagán, J. y Ibarz, A. (2016). Kinetics of color development in glucose/amino acid model systems at different temperatures. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 15-21.
- El cronista (2013.) La revancha de las galletitas. Disponible en <http://www.cronista.com/pyme/La-revancha-de-las-galletitas-20130801-0020.html> [Acceso 09/01/17]
- Embuscado, M. E. (2015). Spices and herbs: natural sources of antioxidants: A mini review. *Journal of Functional Foods*, 18, 811-819.
- Elgart, J., Pfrirter, G., Gonzalez, L., Caporale, J., Cormillot, A., Chiappe, M. L. y Gagliardino, J. (2010). Obesidad en Argentina: epidemiología, morbimortalidad e impacto económico. *Revista Argentina de Salud Pública*, 1(5), 6-12.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A. y Ab Wahab, M. S. (2012). Honey: a novel antioxidant. *Molecules*, 17(4), 4400-4423.
- Eriksson, C. E. (1982). Lipid oxidation catalysts and inhibitors in raw materials and processed foods. *Food Chemistry*, 9(1), 3-19.
- Escrache, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M. y Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, 112(2), 329-338.
- Escuredo, O., Seijo, M. C. y Fernández-González, M. (2011). Descriptive analysis of *Rubus* honey from the north-west of Spain. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(11), 2329-2336.
- Estepa, V., Ródenas, S. y Martín, M. C. (2009). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 67(3).
- Estévez, M., Ventanas, S. y Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: effect on color and texture deterioration. *Journal of Food Science*, 70(7), c427-c432.
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G. y Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774-3779.

F

- Faist, V. y Erbersdobler, H. F. (2001). Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45(1), 1-12.

- FAO/OMS (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Who Technical Report Series, Ginebra, Suiza
- Fayle, S. E. y Gerrard, J. A. (2002). The Maillard Reaction. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Gran Bretaña.
- Fennema O. (1993). Capítulo 2: Agua y Hielo. En Química de los Alimentos, 1° ed. Acribia, Zaragoza, España. Pp 29-79.
- Fogliano, V., Monti, S. M., Musella, T., Randazzo, G. y Ritieni, A. (1999). Formation of coloured Maillard reaction products in a gluten-glucose model system. Food Chemistry, 66(3), 293-299.
- Forcone, A. (2003). Plantas nectaríferas utilizadas por *Apis mellifera* L. en la Patagonia extra-andina, Argentina. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales nueva serie, 5(2), 363-369.
- Forcone, A. y Tellería, M. C. (2000). Caracterización palinológica de las mieles de la llanura del río Senguerr (Chubut-Argentina). Darwiniana, 267-271.
- Forcone, A., Aloisi, P. V. y Muñoz, M. (2009). Palynological and physico-chemical characterisation of honeys from the north-west of Santa Cruz (Argentinean Patagonia). Grana, 48(1), 67-76.
- Francis, F. J. y Clydesdale, F. M. (1975). Food colorimetry: theory and applications. AVI Publishing Co. Inc, Westport, Connecticut, Estados Unidos.
- Frankel, S., Robinson, G. E. y Berenbaum, M. R. (1998). Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. Journal of Apicultural Research, 37(1), 27-31.
- Fritz M. (2009). Desarrollo de un sistema de adquisición de datos para la medición de la presión arterial de la rata Su uso para el estudio de los efectos de los hidrolizados de amaranto sobre el sistema vascular. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Fritz, M. y Rinaldi, G.J. (2008). Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: Influence of adrenergic-and nitric oxide-mediated vasomotion. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 58, 215-221.

G

- Gao, C., Gao, Z., Greenway, F. L., Burton, J. H., Johnson, W. D., Keenan, M. J., ... y Zheng, J. (2015). Oat consumption reduced intestinal fat deposition and improved health span in *Caenorhabditis elegans* model. Nutrition Research, 35(9), 834-843.

- Garcia Loreda, A. B. y Guerrero, S. N. (2011). Correlation between instrumental and sensory ratings by evaluation of some texture reference scales. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(9), 1977-1985.
- Garcia-Serna, E., Martinez-Saez, N., Mesias, M., Morales, F. J. y Castillo, M. (2014). Use of coffee silverskin and stevia to improve the formulation of biscuits. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(4), 243-251.
- Gélinas, P. y McKinnon, C. M. (2006). Effect of wheat variety, farming site, and bread-baking on total phenolics. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(3), 329-332.
- Gheldof, N. y Engeseth, N.J. (2002) .Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3050-3055.
- Glei, M., Kirmse, A., Habermann, N., Persin, C. y Pool-Zobel, B. L. (2006). Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutrition and Cancer*, 56(2), 182-192.
- Glibowski, P., Zarzycki, P. y Krzepakowska, M. (2008). The rheological and instrumental textural properties of selected table fats. *International Journal of Food Properties*, 11(3), 678-686.
- Goering, H. K. y Van Soest, P. J. (1970). Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). En *United States Department of Agriculture (Ed.). Agricultural handbook*. US Government Printing Office, Washington, DC, Estados Unidos.
- Gökmen, V. y Senyuva, H. Z. (2006). Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2845-2849.
- Gökmen, V. y Sügüt, I. (2007). A non-contact computer vision based analysis of color in foods. *International Journal of Food Engineering*, 3(5).
- Gökmen, V., Serpen, A y Fogliano, V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology*, 20(6), 278-288.
- Gómez A. (2016). Modelos, espacios y perfiles de color. Disponible en <http://www.auregomez.com/tutoriales/modelos-espacios-y-perfiles-de-color>. [Acceso 28/05/2016]
- Gonzales, A. P., Naranjo, G. B., Leiva, G. E. y Malec, L. S. (2010). Maillard reaction kinetics in milk powder: Effect of water activity at mild temperatures. *International Dairy Journal*, 20(1), 40-45.

- González-Miret, M. L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. Á. y Heredia, F. J. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(7), 2574-2580.
- González-Rosendo, G., Polo, J., Rodríguez-Jerez, J. J., Puga-Díaz, R., Reyes-Navarrete, E. G., y Quintero-Gutiérrez, A. G. (2010). Bioavailability of a Heme-Iron Concentrate Product Added to Chocolate Biscuit Filling in Adolescent Girls Living in a Rural Area of Mexico. *Journal of Food Science*, 75(3), H73-H78.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M. y Raymundo, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 891-896.
- Graf, M., Amrein, T. M., Graf, S., Szalay, R., Escher, F. y Amadò, R. (2006). Reducing the acrylamide content of a semi-finished biscuit on industrial scale. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 724-728.
- Gruenwald, J., Freder, J. y Armbruester, N. (2010). Cinnamon and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(9), 822-834.
- Guerra, J. E. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18 (6), 326-335).
- Gui, J. G. y Amenós, A. M. (2000). Fenómenos oxidativos en la fisiopatología vascular. *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 17(1), 17-21.
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N. y Gallagher, E. (2010). Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 318-328.
- Gutierrez Sieiro M.B (2014). Grasas trans: 10 alimentos “prohibidos” por la nueva ley. *Diario Popular*. Disponible en <http://www.diariopopular.com.ar/notas/210624-grasas-trans-10-alimentos-prohibidos-la-nueva-ley> [Acceso 09/01/17]

H

- Hager, A. S., Ryan, L. A., Schwab, C., Gänzle, M. G., O'Doherty, J. V. y Arendt, E. K. (2011). Influence of the soluble fibres inulin and oat β -glucan on quality of dough and bread. *European Food Research and Technology*, 232(3), 405-413.
- Hamilton, R.J. (1983). The chemistry of rancidity in foods. En *Food Rancidity*. Applied Science Publishers Ltd, Londres, Gran Bretaña. Pp 1-20.
- Hara, A. y Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90(1), 420-426.

- Harris, N. E., Westcott, D. E. y Henick, A. S. (1972). Rancidity in almonds: shelf life studies. *Journal of Food Science*, 37(6), 824-827.
- Hasler, C. M. y Brown, A. C. (2009). Position of the American Dietetic Association: functional foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 735-746.
- Helou, C., Marier, D., Jacolot, P., Abdennebi-Najar, L., Niquet-Léridon, C., Tessier, F. J. y Gadonna-Widehem, P. (2014). Microorganisms and Maillard reaction products: a review of the literature and recent findings. *Amino Acids*, 46(2), 267-277.
- Hernández, E. (2005). Evaluación sensorial. Universidad Nacional Abierta y a Distancia-UNAD, Bogotá, Colombia.
- Hleap, J. I. y Velasco, V. A. (2010). Análisis de las propiedades de textura durante el almacenamiento de salchichas elaboradas a partir de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Biotecnología en el Sector agropecuario y agroindustrial*, 8(2), 46-56.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. y Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604-611.
- Hough, G., Buera, M. D. P., Chirife, J. y Moro, O. (2001). Sensory texture of commercial biscuits as a function of water activity. *Journal of Texture Studies*, 32(1), 57-74.
- Hozova, B., Buchtová, V., Dodok, L. y Zemanovič, J. (1997). Microbiological, nutritional and sensory aspects of stored amaranth biscuits and amaranth crackers. *Food/Nahrung*, 41(3), 155-158.
- <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/fo/c3fo60702j#!divAbstract>. [Acceso 05/01/2017]
- <http://www.apicultura.entupc.com/nuestrarevista/nueva/notas/conservacion.htm>. [Acceso 06/01/17]
- <http://www.infobae.com/tendencias/nutriglam/2016/07/04/postres-y-dulces-por-que-son-la-debilidad-de-los-argentinos/> [Acceso 06/01/17]
- <http://www.floraargentina.edu.ar/detalleespecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=vulgaris&espcod=9300&genero=Prunella&autor=6&deDonde=4> / [Acceso 06/01/17]
- http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10169&lang=en. Acceso [Acceso 04/01/2017]
- <http://www.pherobase.com/database/floral-compounds/floral-taxa-compounds-detail-lilac%20aldehyde%20D.php> [Acceso 06/01/2017]
- <http://www.swantech.fr/APPLICATIONS/Biscuits.html> [Acceso 05/01/2017]
- <http://www.telam.com.ar/notas/201504/103274-pastas-leches-galletitas-dulces-yerba-mate-productos-mas-demandados.html>, 20015 [Acceso 04/01/2017]

- https://www.3tres3.com/nutricion/fuentes-de-grasa-vegetales-como-alternativa-a-las-grasas-animales_71/ [Acceso, 28/05/2016]
- <https://catalyst.uw.edu/workspace/file/download/f2b921470e396c81e42364e986e58d13335731d678c16d28edd717813b28be8e>. [Acceso 09/01/2017]
- https://www.sartorius.com/fileadmin/fm-dam/DDM/Photos/Lab-Products-and-Services/Lab-Filtration/Ultrafiltration-Devices/Vivaflow/LT_Vivaflow_4004.jpg. [Acceso 08/01/2017]
- Huchet, V., Pavan, S., Lochardet, A., Divanac'h, M. L., Postollec, F. y Thuault, D. (2013). Development and application of a predictive model of *Aspergillus candidus* growth as a tool to improve shelf life of bakery products. *Food Microbiology*, 36(2), 254-259.
- Hwang, I. G., Kim, H. Y., Woo, K. S., Lee, J. y Jeong, H. S. (2011). Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar–amino acid model system. *Food Chemistry*, 126(1), 221-227.

I

- IDF-ISO (2006). Milk fat. Determination of peroxide value. ISO 3976:2006/ IDF 74: 2006. ISO e IDF, Ginebra, Suiza.
- INDEC (2013). Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Disponible en <http://www.saha.org.ar/pdf/3-ENFR.pdf> [Acceso 04/01/2017]
- INTI (2012). Apoyo al trabajo popular Envases y Embalajes, coordinado por Yamila Mathon, 1° ed. INTI, San Martín, Buenos Aires, Argentina.
- IRAM, 15931 (1994). Miel. Determinación de la humedad.
- IRAM, 15937 (1995) Miel. Determinación de hidroximetilfurfural-método de White
- IRAM, 15945 (1994) Miel. Determinación de la conductividad eléctrica.
- Isla, M. I., Craig, A., Ordoñez, R., Zampini, C., Sayago, J., Bedascarrasbure, E., ... y Maldonado, L. (2011). Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1922-1930.
- Isleroglu, H., Kemerli, T., Sakin-Yilmazer, M., Guven, G., Ozdestan, O., Uren, A. y Kaymak-Ertekin, F. (2012). Effect of steam baking on acrylamide formation and browning kinetics of cookies. *Journal of food science*, 77(10), E257-E263.

J

- Jakhetia, V., Patel, R., Khatri, P., Pahuja, N., Garg, S., Pandey, A. y Sharma, S. (2010). Cinnamon: a pharmacological review. *Journal of Advanced Scientific Research*, 1(2), 19-23.

- Jensen, S., Oestdal, H., Clausen, M. R., Andersen, M. L. y Skibsted, L. H. (2011). Oxidative stability of whole wheat bread during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 637-642.
- Jimenez-Escrig, A., Dragsted, L. O., Daneshvar, B., Pulido, R. y Saura-Calixto, F. (2003). In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5540-5545.
- Jiménez-Escrig, A., Gómez-Ordóñez, E., Tenorio, M. D. y Rupérez, P. (2013). Antioxidant and prebiotic effects of dietary fiber co-travelers from sugar Kombu in healthy rats. *Journal of Applied Phycology*, 25, 503-512.

K

- Kadam, S. U. y Prabhasankar, P. (2010). Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Research International*, 43(8), 1975-1980.
- Kasangian, H. J. (2012). Jarabe de maíz de alta fructosa y su relación con la obesidad. *Revista electrónica de Ciencias Aplicadas al Deporte*, 5(18).
- Kaškonienė, V., Maruška, A., Kornysova, O., Charczun, N., Ligor, M. y Buszewski, B. (2009). Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey. *Cheminé technologija*, 52(3), 74-80.
- Keijbets, E. L., Chen, J., Dickinson, E. y Vieira, J. (2009). Surface energy investigation of chocolate adhesion to solid mould materials. *Journal of Food Engineering*, 92(2), 217-225.
- Kim, J. S. y Lee, Y. S. (2009). Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time. *Food Chemistry*, 116(1), 227-232.
- Kitrytė, V., Adams, A., Venskutonis, P. R. y De Kimpe, N. (2012). Impact of lipid oxidation-derived aldehydes and ascorbic acid on the antioxidant activity of model melanoidins. *Food Chemistry*, 135, 1273-1283.
- Kolthoff, I. M. y Medalia, A. I. (1951). Determination of organic peroxides by reaction with ferrous iron. *Analytical Chemistry*, 23(4), 595-603.
- Kretschmer, C. B., Nowakowska, J. y Wiebe, R. (1946). Solubility of oxygen and nitrogen in organic solvents from—25° to 50° C. *Industrial y Engineering Chemistry*, 38(5), 506-509.
- Kuś, P.M., Congiu, F., Teper, D., Sroka, Z., Jerkovic, I. y Tuberoso, C.I.G. (2014). Antioxidant activity, color characteristics, totalphenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloralhoney types. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 124–130

L

Referencias Bibliográficas

- Lab Britania (2015)^b Mac Conkey, Caldo. Disponible en <http://www.britanialab.com/productos/B02142%20REV%2001-MAC%20CONKEY%20CALDO.pdf> [Acceso 06/01/2017]
- Lab Britania (2015)^a. MRS Agar. Disponible en <http://www.britanialab.com/productos/B02205%20REV%2001-MRS%20AGAR.pdf> [Acceso 06/01/2017]
- Lab Britania (2016). Tioglicano como USP como indicador Medio. En <http://www.britanialab.com/productos/B02140%20REV%2001-TIOGLICOLATO%20USP%20CON%20INDICADOR%20MEDIO.pdf>. [Acceso 06/01/2017]
- Lado, M. B., Burini, J., Rinaldi, G., Añón, M. C. y Tironi, V. A. (2015). Effects of the dietary addition of amaranth (*amaranthus mantegazzianus*) protein isolate on antioxidant status, lipid profiles and blood pressure of rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 371-379.
- Lamuela-Raventós, R. M., Romero-Pérez, A. I., Andrés-Lacueva, C. y Tornero, A. (2005). Review: health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International*, 11(3), 159-176.
- Langner, E. y Rzeski, W. (2014). Biological properties of melanoidins: A review. *International Journal of Food Properties*, 17, 344-353.
- Laparra, J. M. y Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61(3), 219-225.
- Lara, E., Cortés, P., Briones, V. y Perez, M. (2011). Structural and physical modifications of corn biscuits during baking process. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 622-630.
- Leal M. (2016). Estudio panorámico de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva alimentos funcionales. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Lezcano E. (2006). Galletitas Industriales Análisis de Cadena Alimentaria. Alimentos Argentinos. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/farinaceos/Productos/Galletitas_2006/galletitas_industriales.htm [Acceso 31/01/2017]
- Lezcano E. (2011). Informe de producto: Galletitas y bizcochos. Alimentos Argentinos. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/farinaceos/Productos/GalletitasBizcochos_2011_12Dic.pdf [Acceso 31/01/2017]
- Lezcano, E. (2015) Galletitas y Bizcochos, Informe de Producto N°4 Agosto 2015 Área de Estudios Sectoriales – Dirección de Agroalimentos. Disponible en

- http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/farinaceos/Productos/2015/GalletitasBizcochos_2015_08Ago.pdf [Acceso 31/01/2017]
- Lindenmeier, M., Faist, V. y Hofmann, T. (2002). Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6997-7006.
- Lindsay, R.C (2010). Capítulo 11: Aditivos Alimentarios. En *Química de los alimentos*, 3° ed.. Acribia, Zaragoza, España. Pp 685-747
- López, L. B. y Suárez, M. M. (2003). *Fundamentos de nutrición normal*, 1° ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.
- Louveaux, J., Maurizio, A. y Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee world*, 59(4), 139-157.
- Lu, M., Yuan, B., Zeng, M. y Chen, J. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*, 44(2), 530-536.
- Lupano, C. E. (2013). *Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento*, 1° ed. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Lupano, C. E., Dumay, E. y Cheftel, J. C. (1992). Gelling properties of whey protein isolate: influence of calcium removal by dialysis or diafiltration at acid or neutral pH. *International Journal of Food Science & Technology*, 27(6), 615-628.

M

- Maache-Rezzoug, Z., Bouvier, J. M., Allaf, K. y Patras, C. (1998). Effect of principal ingredients on rheological behaviour of biscuit dough and on quality of biscuits. *Journal of Food Engineering*, 35(1), 23-42.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. y Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- Maheshwari, N. (2016). *Overview of plant-based natural antioxidants and effect of thermal decomposition*. Tesis Doctoral, Kansas State University, Kansas, Estados Unidos
- Malacalza, N. H., Caccavari, M. A., Fagúndez, G. y Lupano, C. E. (2005). Unifloral honeys of the province of Buenos Aires, Argentine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(8), 1389-1396.

- Manley D. (1983). Tecnología de la Industria Galletera: Galletas crackers y otros horneados. Acribia, Zaragoza España.
- Manley, D. (1998). Biscuit, Cookie and Cracker Manufacturing Manuals: Manual 6: Biscuit Packaging and Storage (Vol. 6). Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido.
- Manley, D. (2000). Technology of biscuits, crackers and cookies. 3ª ed. Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido.
- Marchetti, L. (2014). Alternativas tecnológicas para el desarrollo de productos cárnicos emulsionados saludables. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Argentina
- Marchetti, L., Argel, N., Andrés, S. C. y Califano, A. N. (2015). Sodium-reduced lean sausages with fish oil optimized by a mixture design approach. Meat Science, 104, 67-77.
- Marko, D., Habermeyer, M., Kemény, M., Weyand, U., Niederberger, E., Frank, O. y Hofmann, T. (2003). Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. Chemical Research in Toxicology, 16(1), 48-55.
- Martín, M. Á., Ramos, S., Mateos, R., Rufián-Henares, J. A., Morales, F. J., Bravo, L. y Goya, L. (2009). Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(16), 7250-7258.
- Martínez-Navarrete, N., Moraga, G., Talens, P. y Chiralt, A. (2004). Water sorption and the plasticization effect in wafers. International Journal of Food Science and Technology, 39(5), 555-562.
- Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H. y Khan, I. U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. Critical Reviews in Microbiology, 37(1), 91-98.
- Masson L. (1997). Métodos analíticos para la determinación de humedad, alcohol, energía, materia grasa y colesterol en alimentos. En Reducción y Manejo de datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición. FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile, Chile. Pp 147-163.
- McClements, D. J. y Decker E. A. (2010). Capítulo 5: Lípidos. En Química de los alimentos, 3ª ed.. Acribia, Zaragoza, España. Pp 155-214
- McShea, A., Ramiro-Puig, E., Munro, S. B., Casadesus, G., Castell, M. y Smith, M. A. (2008). Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing. Nutrition Reviews, 66(11), 630-641.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. y Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. The American Journal of Clinical Nutrition, 77(5), 1146-1155.

- Merck (2016). Merck Microbiology Manual 12th. Disponible en <https://es.scribd.com/doc/94454909/Merck-Microbiology-Manual-12th> [Acceso 09/01/17]
- Mesías, M., Holgado, F., Márquez-Ruiz, G. y Morales, F. J. (2015). Effect of sodium replacement in cookies on the formation of process contaminants and lipid oxidation. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 633-639.
- Metrohm (2001). 743 Rancimat – Instrucciones para el Uso. Harisau, Suiza.
- Michalska, A., Amigo-Benavent, M., Zielinski, H. y del Castillo, M. D. (2008). Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *Journal of Cereal Science*, 48(1), 123-132.
- Mihaljević, B., Katušin-Ražem, B. y Ražem, D. (1996). The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(1), 53-63.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Obuchowski, W. y Gośliński, M. (2009). Evaluation of antioxidant activity of green tea extract and its effect on the biscuits lipid fraction oxidative stability. *Journal of Food Science*, 74(8), S362-S370.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... y Dufour, C. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124.
- Ministerio de salud de la Nación (2011). Segunda encuesta nacional de factores de riesgo para enfermedades no transmisibles. Disponible en http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000570cnt-2014-10_encuesta-nacional-factores-riesgo-2011_informe-final.pdf. [Acceso 04/01/2017]
- Ministerio de Salud de la Nación (2016). Informes Especiales: Cómo evitar enfermedades cardiovasculares y prevenir el cáncer. Disponible en http://www.msal.gob.ar/prensa/images/stories/Informes-especiales/inf_esp_01.pdf. [Acceso 04/01/2017]
- Mišan, A., Mimica-Dukić, N., Sakač, M., Mandić, A., Sedej, I., Šimurina, O. y Tumbas, V. (2011). Antioxidant activity of medicinal plant extracts in cookies. *Journal of Food Science*, 76(9), C1239-C1244.
- Mohamad, R., Seyed, H. M., Selamat, J. y Hussain, N. (2016). Effect of extraction methods on yield, oxidative value, phytosterols and antioxidant content of cocoa butter. *International Food Research Journal*, 23(1), 47-54.
- Monente, C., Bravo, J., Vitas, A. I., Arbillaga, L., De Peña, M. P. y Cid, C. (2015). Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *Journal of Functional Foods*, 12, 365-374.

- Morales, F. J. y Van Boekel, M. A. J. S. (1997). A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescence accumulation. *International Dairy Journal*, 7(11), 675-683.
- Morales, F. J. y Van Boekel, M. A. J. S. (1998). A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. *International Dairy Journal*, 8(10), 907-915
- Morales, F. J. y Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72(1), 119-125.
- Morales, F. J., Fernández-Fraguas, C. y Jiménez-Pérez, S. (2005). Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chemistry*, 90(4), 821-827.
- Morales, F. J., Martín, S., Açar, Ö. Ç., Arribas-Lorenzo, G. y Gökmen, V. (2009). Antioxidant activity of cookies and its relationship with heat-processing contaminants: a risk/benefit approach. *European Food Research and Technology*, 228(3), 345-354.
- Morales, F. J., Somoza, V. y Fogliano, V. (2012). Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, 42(4), 1097-1109.
- Moreno, C. (2012). Un tema complejo. Normativa y alimentos funcionales. *Alimentos Argentinos*, 55, 60-63.
- Morrison, W. R. y Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5(4), 600-608.
- Mouteira, M. C., Malacalza, N. H., Lupano, C. E. y Baldi, B. M. (2001). Analysis of honey produced in the province of Buenos Aires, Argentina, from 1997 to 2000. *Apimondia 2001*, 1-7.
- Mudgil, D. y Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International journal of biological macromolecules*, 61, 1-6.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C. y Anderson-Cook, C. M. (2009). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Hoboken, New Jersey, Estados Unidos

N

- Nagi, H. P. S., Kaur, J., Dar, B. N. y Sharma, S. (2012). Effect of storage period and packaging on the shelf life of cereal bran incorporated biscuits. *American Journal of Food Technology*, 7(5), 301-310.

- Nattress, L. A., Ziegler, G. R., Hollender, R. y Peterson, D. G. (2004). Influence of hazelnut paste on the sensory properties and shelf-life of dark chocolate. *Journal of Sensory Studies*, 19(2), 133-148.
- Nawar W. (2000). Capítulo 5: Lípidos En Química de los Alimentos, 2da ed. Acribia, Zaragoza, España Pp 269-378
- Nielsen, N. S., Heinrich, T. M. y Jacobsen, C. (2003). Comparison of wetchemical methods for determination of lipid hydroperoxides. *Journal of Food Lipids*, 10(1), 35-50.
- Nightingale, L. M., Lee, S. Y. y Engeseth, N. J. (2011). Impact of storage on dark chocolate: texture and polymorphic changes. *Journal of Food Science*, 76(1), C142-C153.

O

- Odeh, I., Abu-Lafi, S., Dewik, H., Al-Najjar, I., Imam, A., Dembitsky, V. M. y Hanuš, L. O. (2007). A variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgata*. *Food Chemistry*, 101(4), 1393-1397.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L. y Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20-33.
- Olivares, S. y Zacarías, L. (2013). Estudio para revisión y actualización de las guías alimentarias para la población chilena. Ministerio de Salud, Santiago de Chile, Chile
- Oliveira, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., ... & Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503.
- OMS (2003). Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series 916, Ginebra, Suiza.
- Oroian, M., Padureț, S., Amariei, S. y Gutt, G. (2016). Chemical composition and temperature influence on honey texture properties. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 431-440.
- Oste, R. y Sjödin, P. (1984). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vivo studies on rats. *The Journal of Nutrition*, 114, 2228-2234.
- Öztürk, S., Özboy, Ö., Cavidoğlu, İ. y Köksel, H. (2002). Effects of brewer's spent grain on the quality and dietary fibre content of cookies. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(1), 23-27.

P

- Pallarés, M., León, A. y Rosell C. (2007). Capítulo 1: Trigo. En de Tales Harinas, Tales Panes: Granos, Harinas y Productos de Panificación en Iberoamérica. 1a ed. Alberto Edel León y Cristina M. Rosell Editores, Córdoba, Argentina. Pp 19-7
- Pareyt, B., Talhaoui, F., Kerckhofs, G., Brijs, K., Goesaert, H., Wevers, M. y Delcour, J. A. (2009). The role of sugar and fat in sugar-snap cookies: Structural and textural properties. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 400-408.
- Passos, M. E. A. D., Moreira, C. F. F., Pacheco, M. T. B., Takase, I., Lopes, M. L. M. y Valente-Mesquita, V. L. (2013). Proximate and mineral composition of industrialized biscuits. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(2), 323-331.
- Pastoriza de la Cueva, S. y Rufián-Henares, J. A. (2014). Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. *Food Chemistry*, 164, 438-445.
- Pastoriza de la Cueva, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A. y Rufián-Henares, J. A. (2011). A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry*, 129(4), 1926-1932.
- Pathare, P. B., Opara, U. L. y Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60.
- Patrignani, M., Conforti, P. A. y Lupano, C. E. (2015)^a. Lipid oxidation in biscuits: comparison of different lipid extraction methods. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9(1), 104-109.
- Patrignani, M., Conforti, P. A. y Lupano, C. E. (2014). The role of lipid oxidation on biscuit texture during storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(8), 1925-1931.
- Patrignani, M., Bernardelli, C., Conforti, P. A., Malacalza, N. H., Yamul, D. K., Donati, E. y Lupano, C. E. (2015)^b. Geographical discrimination of honeys through antioxidant capacity, mineral content and colour. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(12), 2598-2605.
- Patrignani, M., Lupano, C. E., & Conforti, P. A. (2016). Color, cenizas y capacidad antioxidante de mieles de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 115(1): 77-82
- Peleg, M. (1979). Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. *Journal of Food Science*, 44(1), 277-281.
- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M. J. y Farré, R. (2008). Antioxidant capacity of infant fruit beverages; influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion. *Nutrición Hospitalaria*, 23(6), 547-553.

- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., Mesías, M., Morales, F. J. y Saura-Calixto, F. (2014). Evidence for the formation of maillardized insoluble dietary fiber in bread: A specific kind of dietary fiber in thermally processed food. *Food Research International*, 55, 391-396.
- Perkin-Elmer (1996). *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy*. The Perkin-Elmer Corporation. Norwalk, Connecticut, Estados Unidos.
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Sofo, A. y Gambacorta, E. (2012). Metal content of southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 1909-1917.
- Petersen, K., Nielsen, P. V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilsson, N. H. y Mortensen, G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 10(2), 52-68.
- Peterson, G., Aguilar, D., Espeche, M., Mesa, M., Jáuregui, P., Díaz, H., ... & Tavella, M. (2004). Ácidos grasos trans en alimentos consumidos habitualmente por los jóvenes en Argentina. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 102(2), 109.
- Petrofsky, K. E. y Hosene, R. C. (1995). Rheological properties of dough made with starch and gluten from several cereal sources. *Cereal Chemistry*, 72(1), 53-57.
- Pisoschi, A. M. y Negulescu, G. P. (2012). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1-10.
- Prior, R. L., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Purlis, E. (2010). Browning development in bakery products—a review. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 239-249.
- Purlis, E. y Salvadori, V. O. (2010). A moving boundary problem in a food material undergoing volume change—simulation of bread baking. *Food Research International*, 43(4), 949-958.

Q

- Quílez, J., Ruiz, J. A., Brufau, G y Rafecas, M. (2006). Bakery products enriched with phytosterols, α -tocopherol and β -carotene. Sensory evaluation and chemical comparison with market products. *Food Chemistry*, 94(3), 399-405.
- Quintero Gutiérrez, A. G., Rodríguez Jerez, J. J., & Polo Pozo, J. (2003). Desarrollo de un alimento funcional a partir de hierro hémico y evaluación de su Biodisponibilidad, para la

prevención y corrección de la deficiencia de hierro. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.

- Quintero-Gutiérrez, A. G., González-Rosendo, G., Sánchez-Muñoz, J., Polo-Pozo, J. y Rodríguez-Jerez, J. J. (2008). Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *International Journal of Biological Sciences*, 4(1), 58-62.
- Quintero-Gutiérrez, A. G., Mariaca-Gaspar, G. I., Villanueva-Sánchez, J., Polo, J., Rodríguez, C. y González-Rosendo, G. (2012). Acceptability and use of heme-iron concentrate product added to chocolate biscuit filling as an alternative source of a highly available form of iron. *CyTA-Journal of Food*, 10(2), 112-118.

R

- Rader, D. J. y Daugherty, A. (2008). Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*, 451(7181), 904-913.
- Ragone, F. (2015). Estudios fotoquímicos y fotofísicos en complejos tricarbónicos de Renio (I) y su interacción con biopolímeros. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
- Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., González, J. A. U y Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año*, 2(7).
- Ramírez-Jiménez, A., García-Villanova, B. y Guerra-Hernández, E. (2001). Effect of toasting time on the browning of sliced bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 513-518.
- Ramírez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E. y García-Villanova, B. (2003). Evolution of non-enzymatic browning during storage of infant rice cereal. *Food Chemistry*, 83(2), 219-225.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. y Fahey Jr, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal Nutrition*, 123, 1939-1951.
- Rodríguez-Iturbe, B., Zhan, C. D., Quiroz, Y., Sindhu, R. K. y Vaziri, N. D. (2003). Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 41, 341-346.

- Rogers, D. (2004). Functions of fats and oils in bakery products. *Inform-Champaign*, 15, 572-574.
- Roncero-Ramos, I. (2013). Consumo de glicoproteínas del pan: implicaciones en el metabolismo fosfocálcico y óseo. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Granada, España
- Roncero-Ramos, I., Delgado-Andrade, C., Alonso-Olalla, R. y Navarro, M. P. (2012). Influence of bread crust-derived Maillard reaction products on phosphorus balance in rats. *European journal of nutrition*, 51(7), 871-879.
- Roncero-Ramos, I., Pastoriza de la Cueva, S., Navarro, M. P. y Delgado-Andrade, C. (2013)^a. Consumption of model Maillard reaction products has no significant impact on Ca and Mg retention or tissue distribution in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 83(4), 246-253.
- Roncero-Ramos, I., Delgado-Andrade, C., Tessier, F. J., Niquet-Léridon, C., Strauch, C., Monnier, V. M. y Navarro, M. P. (2013)^b. Metabolic transit of N ϵ -carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food & Function*, 4(7), 1032-1039
- Roncero-Ramos, I., Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. Á., Carballo, J. y Navarro, M. P. (2013)^c. Effects of model Maillard compounds on bone characteristics and functionality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2816-2821.
- Roncero-Ramos, I., Delgado-Andrade, C., Morales, F. J. y Navarro, M. P. (2013)^d. Influence of Maillard products from bread crust on magnesium bioavailability in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(8), 2002-2007.
- Rufián-Henares J.A, Delgado-Andrade C. y Morales F (2009). Non-enzymatic browning:the case of the maillard reaction. En *Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods*. Atrio. Granada, Granada, España. pp 9-33
- Rufián-Henares, J. A. y Morales, F. J. (2007)^a. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40(8), 995-1002.
- Rufián-Henares, J. A. y Morales, F. J. (2007)^b. Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10016-10021.
- Rufián-Henares, J. A. y Pastoriza de la Cueva, S. (2009). Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins: A Study of Their Metal-Chelating Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 432-438.

- Rufián-Henares J.A. y Delgado-Andrade C. (2009)^a Antimicrobial activity of Maillard reaction products. En Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods. Atrio. Granada, Granada, España. Pp 63-97
- Rufián-Henares, J. A. y Delgado-Andrade, C. (2009)^b. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. Food Research International, 42(3), 394-400.
- Rufián-Henares, J. Á., Guerra-Hernandez, E. y García-Villanova, B. (2006). Colour measurement as indicator for controlling the manufacture and storage of enteral formulas. Food Control, 17(6), 489-493.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., Zaldivar-Cruz, J. M., Kuri, V. y Pérez-Álvarez, J. Á. (2011). Antioxidant activity of artisanal honey from Tabasco, Mexico. International Journal of Food Properties, 14(2), 459-470.

S

- Sánchez J.L (1994). Marketing: El envase Disponible en: http://www.tecsima.com.ar/facebook/EL_ENVASE.pdf [Acceso 09/01/2017]
- Sant'Ana, L. D. O., Sousa, J. P., Salgueiro, F. B., Lorenzon, M. C. A. y Castro, R. N. (2012). Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. Journal of Food Science, 77(1), C135-C140.
- Šarić, G., Marković, K., Major, N., Krpan, M., Uršulin-Trstenjak, N., Hruškar, M. y Vahčić, N. (2012). Changes of antioxidant activity and phenolic content in acacia and multifloral honey during storage. Food Technology and Biotechnology, 50(4), 434-441.
- Sanriá, B. y Vaquero, M. P. (2001). Zinc and iron bioavailability in a powder or in-bottle-sterilized infant formula estimated by in vitro and in suckling rats. The Journal of Nutritional Biochemistry, 12, 266-273.
- Saura Calixto (2010). Fibra dietética en la dieta y en alimentos funcionales. Prebióticos. En Alimentos saludables y de diseño específico. Alimentos funcionales. International Marketing and Communications S.A., Madrid, España. Pp 97-107.
- Saura-Calixto, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(1), 43-49.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J. y Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. Food Chemistry, 101(2), 492-501.

- Sedej, I., Sakač, M., Mandić, A., Mišan, A., Pestorić, M., Šimurina, O., y Čanadanović-Brunet, J. (2011). Quality assessment of gluten-free crackers based on buckwheat flour. *LWT-Food Science and Technology*, 44(3), 694-699.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V. y Gökmen, V. (2007). A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7676-7681.
- Serrano, O. M., Lopez Martinez, M. y Lopez de la Serrana H. (2006). Capítulo 25: Aspectos bromatológicos y toxicológicos de colorantes y conservantes en Toxicología Alimentaria. Diaz de Santos, Madrid, España. Pp 463-491.
- Shantha, N. C. y Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424.
- Shibukawa, S., Sugiyama, K. y Yano, T. (1989). Effects of heat transfer by radiation and convection on browning of cookies at baking. *Journal of Food Science*, 54(3), 621-624.
- Silva, L. R., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão, P. y Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, 93(1), 73-77.
- Sinnhuber, R. O., Yu, T. C. y Yu, T. C. (1958). Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Journal of Food Science*, 23(6), 626-634.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B. y Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. y Crouch, S. R. (2008). Principios de análisis instrumental, 6ta ed. Cengage Learning, Mexico DF, Mexico,
- Somoza, V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(7), 663-672.
- Somoza, V., Wenzel, E., Lindenmeier, M., Grothe, D., Erbersdobler, H. F. y Hofmann, T. (2005). Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(21), 8176-8182.
- Sönmez, M., Türk, G., y Yüce, A. (2005). The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, 63, 2063-2072.

- Soong, Y. Y., Quek, R. Y. C. y Henry, C. J. (2015). Glycemic potency of muffins made with wheat, rice, corn, oat and barley flours: a comparative study between in vivo and in vitro. *European Journal of Nutrition*, 54(8), 1281-1285.
- Soong, Y. Y., Tan, S. P., Leong, L. P. y Henry, J. K. (2014). Total antioxidant capacity and starch digestibility of muffins baked with rice, wheat, oat, corn and barley flour. *Food Chemistry*, 164, 462-469.
- Sosa, M. (2011). Optimización de la aceptabilidad sensorial y global de productos elaborados con amaranto destinados a programas sociales nutricionales . Tesis doctoral , Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
- Stashenko, E. E. y Martínez, J. R. (2013) Análisis de fragancias florales por GC-MS. *Scientia Chromatographica* 2013; 5(1):7-25
- Stashenko, E. y Martínez, J. R. (2010). GC-MS: Más de un analizador de masas, ¿Para qué?. *Scientia Chromatographica*, 2(4), 33-59.
- StatPoint (2006). Diseño de Experimentos: Optimización de Múltiples Respuestas . Disponible en: <http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20-%20Optimizacion%20de%20Multiples%20Respuestas.pdf> [Acceso 06/01/2017]
- Steffe, J. F. (1996). Rheological methods in food process engineering, 2^{da} ed.. Freeman press, East Lansing, Michigan, Estados Unidos.
- Szczesniak, A. S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13(4), 215-225.

T

- Tananaki, C (2006). A study of factors affecting the volatile compounds of honeydew honeys. Tesis doctoral School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Salonica, Grecia.
- Tananaki, C., Gounari, S. y Thrasyvoulou, A. (2009). The effect of smoke on the volatile characteristics of honey. *Journal of apicultural research*, 48(2), 142-144.
- Tananaki, C., Thrasyvoulou, A. y Menexes, G. (2005)^b. Absorption of volatile compounds in honey from stored spices. *Journal of Apicultural Research*, 44(2), 71-77.
- Tananaki, C., Thrasyvoulou, A., Giraudel, J. L. y Montury, M. (2007). Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using Kohonen self organising maps. *Food Chemistry*, 101(4), 1687-1693.
- Tananaki, C., Zotou, A. y Thrasyvoulou, A. (2005)^a. Determination of 1, 2-dibromoethane, 1, 4-dichlorobenzene and naphthalene residues in honey by gas chromatography-mass

- spectrometry using purge and trap thermal desorption extraction. *Journal of Chromatography A*, 1083(1), 146-152..
- Tanti, R., Barbut, S. y Marangoni, A. G. (2016). Hydroxypropyl methylcellulose and methylcellulose structured oil as a replacement for shortening in sandwich cookie creams. *Food Hydrocolloids*, 61, 329-337.
- Tavella, M., Peterson, G., Espeche, M., Cavallero, E., Cipolla, L., Perego, L. y Caballero, B. (2000). Trans fatty acid content of a selection of foods in Argentina. *Food Chemistry*, 69(2), 209-213.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J. y Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*, 1-12.
- Toyosaki, T. (2007). Effects of hydroperoxide in lipid peroxidation on dough fermentation. *Food Chemistry*, 104(2), 680-685.
- Tribble D.L. y Krauss R.M. (2003). Capítulo 49: Enfermedad cardiovascular Aterosclerótica. En *Conocimientos actuales sobre nutrición*, 8^{va} Ed. International Life Sciences Institute (ILSI), Washington, Estados Unidos. Pp 592-602.
- Tuohy, K. M., Kolida, S., Lustenberger, A. M. y Gibson, G. R. (2001). The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides—a human volunteer study. *British Journal of Nutrition*, 86(03), 341-348.

U

- Uauy, R. y Monteiro, C. A. (2004). The challenge of improving food and nutrition in Latin America. *Food and Nutrition Bulletin*, 25(2), 175-182.
- Ulloa, J. A., Mondragón Cortez, P. M., Rodríguez Rodríguez, R., Reséndiz Vázquez, J. A. y Rosas Ulloa, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*, 2(4), 1-4.

V

- Vademecum Nutrinfo (2016). Tabla de composición de alimentos. Disponible en http://www.nutrinfo.com/tabla_composicion_quimica_alimentos.php?FoodId=1334&marca=Chocolinas&FoodCategory=Pan,%20galletitas%20y%20pasteler%C3%ADa&numberOfResults=40&order=Fecha_Carga&desc=DESC&measure=100gr&page=1#label [Acceso el 22/12/2016]
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., Nieto, S., Petersen, G. y Tavella, M. (2003). Estudio comparativo, en fritura, de la estabilidad de diferentes aceites vegetales. *Aceites y Grasas Magazine*, Rosario-Argentina, 53(4), 568-573.

- Valenzuela, B. y Ronco, M. (2004). Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista Chilena de Nutrición*, 31, 161-16
- Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J. y Martínez-Castro, I. (2001). Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry*, 72(1), 51-58.
- Valussi, M. y Minto, C. (2016). Cacao as a Globalised Functional Food: Review on Cardiovascular Effects of Chocolate Consumption. *The Open Agriculture Journal*, 10(1)36-51
- Van Boekel, M. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, 62(4), 403-414.
- Vargo, D., Moskovitz, M. y Floch, M. H. (1980). Faecal bacterial flora in cancer of the colon. *Gut*, 21(8), 701-705.
- Velásquez, L., Aredo, V., Caipo, Y. y Paredes, E. (2014). Optimización por diseño de mezclas de la aceptabilidad de una galleta enriquecida con quinua (*Chenopodium quinoa*), soya (*Glycinemax*) y cacao (*Theobroma cacao L.*). *Agroindustrial Science*, 4(1), 35-42.
- Vhangani, L. N. y Van Wyk, J. (2013). Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose–lysine and ribose–lysine model systems. *Food Chemistry*, 137(1), 92-98

W

- Wang, H. Y., Qian, H. y Yao, W. R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), 573-584.
- Wang, X. H., Gheldof, N. y Engeseth, N. J. (2004). Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science*, 69(2), fct96-fct101.
- Wardencki, W., Chmiel, T., Dymerski, T., Biernacka, P. y Plutowska, B. (2009). Application of gas chromatography, mass spectrometry and olfactometry for quality assessment of selected food products. *Ecological Chemistry and Engineering*, 16(3), 287-300.
- Whistler, R. y Daniel, J (1993). Capítulo 3: Carbohidratos En Química de los Alimentos, 1ed. Acribia, Zaragoza, España. Pp 29-79.
- Wilczyńska, A. (2014). Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey. *LWT-Food Science and Technology* 57: 767-774.

X

Xu, R. (2012). Oat fibre: overview on their main biological properties. *European Food Research and Technology*, 234(4), 563-569.

Y

Yamul, D. K. y Lupano, C. E. (2003). Properties of gels from whey protein concentrate and honey at different pHs. *Food Research International*, 36(1), 25-33.

Yamul, D. K. y Lupano, C. E. (2005). Whey protein concentrate gels with honey and wheat flour. *Food Research International*, 38(5), 511-522.

Yu, X., Zhao, M., Hu, J., Zeng, S. y Bai, X. (2012). Correspondence analysis of antioxidant activity and UV–Vis absorbance of Maillard reaction products as related to reactants. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 1-9.

Z

Zamora, R. e Hidalgo, F. J. (2005). Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1), 49-59.

Zanoni, B., Peri, C. y Bruno, D. (1995). Modelling of browning kinetics of bread crust during baking. *LWT-Food Science and Technology*, 28(6), 604-609.

Zulueta, A., Maurizi, A., Frígola, A., Esteve, M. J., Coli, R. y Burini, G. (2009). Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal*, 19(6), 380-385.